

Untersuchungen
über den Auxinstoffwechsel, mit besonderer
Berücksichtigung von Indol-3-essigsäure

von

MEINHART ZENK

Untersuchungen über den Auxinstoffwechsel,
mit besonderer Berücksichtigung von Indol-3-essigsäure.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



vorgelegt
von
Meinhart Zenk
aus
Donauwörth

Mai 1959

Berichterstatter: Prof.Dr.A.C.Leopold
Prof.Dr.L.Brauner
Tag der mündl. Prüfung: 27. Mai 1959.

Inhalts - Verzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
III. Ergebnisse	16
1) Enzymatische Aktivierung von Auxinen und Konjugierung mit Aminosäuren	16
a) In vivo Synthese von Indolacetursäure	16
b) Enzymatische Aktivierung von Auxinen unter Pyrophosphatabspaltung von ATP	17
c) Aktivierung von Phenoxysäuren mit verschie- dener Chlorierung	19
d) Konjugierung von Auxinen mit Glycin	22
e) Der Einfluß von Hydroxylamin auf die enzy- matische Synthese von Indolacetursäure ...	24
f) Isolierung von enzymatisch gebildetem IES-CoA	27
g) Kinetik der IES-CoA Bildung	27
h) Bestimmung der Michaelis-Konstante für FAAE mit IES als Substrat	29
i) Die Rolle von Indolacetyladenylat in der Aktivierung von IES	32
k) Reaktion von IES-AMP mit CoA	34
l) Reaktion von IES-AMP mit Pyrophosphat ...	34
m) Enzymatische Hydrolyse von IES-AMP	35
n) Reaktionen von Indolthioessigsäure	36
o) Konjugierung von Benzoesäure mit Asparagin mittels einer Eiweißfraktion aus Leber- mitochondrien	39
2) Stoffwechselprodukte von (Carboxyl) C ¹⁴ NES und (Carboxyl) C ¹⁴ Benzoesäure in Erbsenin- ternodien	42
3) Biologische Aktivität der 2,4-D-Hydroxamsäure.	46
IV. Diskussion der Ergebnisse	54
V. Zusammenfassung	64
VI. Literaturverzeichnis	67



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Trotz intensiver Forschung ist man seit der Entdeckung, daß es sich bei dem pflanzlichen Zellstreckungshormon um β -3-Indol-essigsäure (IES) (Kögl et al. 1934) handelt, der Klärung des Problems des Wachstums unter Wuchsstoffeinfluß kaum nähergekommen. Die Theorien der Wuchsstoffwirkung gabelten sich frühzeitig in solche die vorschlugen, daß die Zunahme an Zellvolumen weitgehend durch die Wasseraufnahme geregelt wird, und solche, die die Wirkung auf Veränderungen in der Zellwand bezogen.

Erstere Theorie erstreckte sich auf Veränderungen des osmotischen Wertes (Czaja 1935), Veränderungen der cytoplasmatischen Viskosität (Northen 1942); Commoner et al. (1942, 1943) zeigten, daß das wuchsstoffinduzierte Wachstum mit der Atmung gekoppelt ist und erklärten es mit einer osmotischen Wasseraufnahme durch eine atmungsinduzierte Salzaufnahme. Bonner et al. (1953) demonstrierten, daß Dinitrophenol die Wasseraufnahme blockieren kann, ohne die Atmungsgeschwindigkeit herabzuminde-
rn und vermuteten, daß Phosphorylierungsprozesse die Energie für die Wasseraufnahme stellen. Diesem Ausschnitt aus den gängigen Hypothesen stehen Theorien gegenüber, die sich auf die Zellwand beziehen. Heyn (1932) fand, daß Wuchsstoff die Dehnbarkeit und Flexibilität der Zellwände stark vermehrte. Er glaubte, daß die vermehrte Dehnbarkeit in einem Absinken des Wanddruckes der Zelle resultierte und so eine Wasseraufnahme erlaube einfach durch den Fall des Turgordruckes. Brauner und Hasman (1952) führen aus, daß der Wuchsstoff die mechanischen Eigenschaften der Zellwand durch Modifizierung des Atmungsstoffwechsels beeinflusst. Diese Annahmen stellen ein Konzept dar, das durch Bonner et al. (1956) voll unterstützt wurde, und dessen wesentliche Teile auch von Busse und Kandler (1956) übernommen wurden. Glasziou (1958) stellte neuerdings eine Hypothese auf, wonach Wuchsstoff die Pektinmethylesterase an die Zellwand bindet, und auf diese Weise eine erhöhte Methylierung der Zellwand eine erhöhte Plastizität hervorruft. Außerdem existieren noch andere Angaben, wonach Wuchsstoffe Einflüsse auf isolierte Enzymsysteme ausüben sollen, so z.B. beobachtete Northen (1942) daß Wuchsstoff die Dissoziation

von Proteinen des Zytoplasmas bewirkt, Thimann (1951) glaubt, daß Wuchsstoffe Schutzfunktionen für "Wachstumsenzyme" ausüben, und Turian (1956) fand daß IES eine Kartoffelphosphatase stimuliert.

Die zitierten Angaben und Theorien sind nur ein kleiner Ausschnitt aus dem tatsächlich vorliegenden Material. Die Heterogenität der Befunde läßt bis heute noch keine Abzeichnung einer den Tatsachen am weitesten entgegenkommende Theorie erkennen. Eine Vielzahl von Arbeiten beschäftigte sich mit den Wirkungen von Wuchsstoffen auf die Zelle, während das Schicksal des Wuchsstoffes in der Zelle unbegreiflicherweise völlig vernachlässigt wurde. Erst 1953 erschien eine Arbeit von Leopold und Guernsey, die die in vivo Reaktion von Wuchsstoffen mit Coenzym A (CoA) mittels Adenosintriphosphat (ATP) und Tomaten-ovarmitochondrien beschrieb. Im gleichen Jahr demonstrierten Siegel und Galston die Reaktion von IES mit Erbsenproteinen in vivo und in vitro ebenfalls mit ATP als Energielieferant. Jedoch erwiesen sich beide Befunde nicht als reproduzierbar (Leopold und Price 1956; Andreae 1958). Kürzlich wurde das Schicksal von Auxinen in pflanzlichen Organen durch Arbeiten des kanadischen Arbeitskreises um Andreae und Good neu aufgenommen. Es konnte dabei gezeigt werden, daß IES mit Asparaginsäure unter Bildung von Indolacetyl-Asparaginsäure (IES-Asparaginsäure) konjugiert wird (Andreae und Good 1955). Beim Verfüttern von Indolbuttersäure an Erbsenstengel fanden Andreas und Good (1957) und Fawcett et al. (1958), daß β -Oxydation der Buttersäure unter Bildung von IES und IES-Asparaginsäure eintritt. Sowohl die Konjugierung von IES mit Asparaginsäure als auch die β -Oxydation von Indolbuttersäure weisen auf das intermediäre Auftreten von Indolacetyl-CoA (IES-CoA) hin. Neben dem Peptid wird in Erbsenstengel auch noch Indolacetamid gebildet (Good et al. 1956), was ebenfalls in Anlehnung an einen Vorschlag von Lynen und Decker (1957) für Nikotinsäureamid über Nikotinyl-CoA das intermediäre Auftreten von IES-CoA wahrscheinlich macht. Auch die Befunde, daß IES in der Zelle an Proteine gebunden ist (vgl. Larsen 1951) weisen daraufhin, daß auch die Proteinbindung über die Stufe einer energiereichen Acylbindung eingegangen wird.

Es ist wahrscheinlich, daß zu einer Klärung des Wuchsstoffmechanismus auch das Schicksal des Wuchsstoffes selbst in der Zelle Beachtung finden muß. Man sieht, daß IES nach indirekten Befunden intermediär an CoA gebunden in der Zelle vorkommt. Wie Leopold (1955) vorschlägt, mag die energiereiche Thioesterbindung von Auxin an CoA ein erstes Glied in der Wachstumsreaktion darstellen. Für den Begriff Auxin gilt die Definition von Thimann (1948) "An organic substance which promotes growth along the longitudinal axis when applied in low concentrations to shoots of plants freed as far as practicable from their own inherited growthpromoting substances". Es war daher Ziel dieser Arbeit, die Aktivierung von Auxinen zu untersuchen. Unter Aktivierung wird dabei die energetische Hebung der Carboxylgruppe der Säuren durch eine Form, die unter den Bedingungen des Zellmilieus mindestens 3000 kal/mol über der freien Säure liegt, verstanden. Nachdem in diesem Laboratorium unter Leitung von Leopold (Leopold und Guernsey 1953, Leopold und Price 1956) die enzymatische Aktivierung von Auxinen mittels ATP und CoA starkes Interesse fand, sollten tierische und pflanzliche Systeme auf die Möglichkeit hin untersucht werden, Wuchsstoffe - besonders IES - enzymatisch diesem Typ entsprechend zu aktivieren. Weiteres Ziel war es, geeignete Tests für die Aktivierung von IES zu finden, den feineren Mechanismus der Aktivierung zu bearbeiten und Seitenreaktionen der aktivierten Produkte - wie Konjugierung mit Aminosäuren in vivo und in vitro - zu verfolgen.

II. Material und Methoden

Bereitung von Lebermitochondrien.

Lebermitochondrien wurden nach einer durch die Umstände erforderlichen Modifizierung der Methode von Mahler et al. (1953) gewonnen. Zu diesem Zwecke wurde eine Kalbsleber sofort nach dem Töten des Tieres in Eis gekühlt und im Kühlraum bei 0- +4° C vom Bindegewebe befreit und in 100 g-Portionen geteilt. Die Portionen wurden zerschnitten und in einen Waring blender (Multimix) gegeben, der 300 ml einer isotonischen Zucker-Phosphatlösung enthielt (85 g Rohrzucker + 5 g K_2HPO_4 pro Liter). Das Gewebe wurde 40-50 sec. zerkleinert, indem man allmählich 10-12 Tropfen 6 M KOH zulaufen ließ, um den pH bei 7 zu halten. Das Homogenat von 200 g Gewebe wurde mit einer 1-Liter International Centrifuge für 6 Minuten bei 1600 x g zentrifugiert. Das Überstehende wurde durch 2 Schichten Gaze filtriert. Nachdem 500 g Leber auf diese Weise aufgearbeitet waren, wurde das Überstehende vereinigt und unter leichtem Schwenken zu 5 Liter 0,9 %iger KCl-Lösung in einer schlanken 3 Gallonen-Flasche gegeben. Der Behälter wurde von außen eisgekühlt und der Ansaugschlauch einer Sharpless Super Centrifuge eingehängt. Die Kühlschlangen der Zentrifuge, die sich bei Zimmertemperatur befand, wurde auf -15° C mit einem Durchlaufbad gekühlt und die Zentrifugierung bei einer Geschwindigkeit von 50 000 rpm durchgeführt. Das Überstehende hatte eine Temperatur von +7 bis +10° C. Der Inhalt des Zentrifugenzyllinders wurde in den Kaltraum übergeführt und mittels des Waring blenders in 200 ml 0,9 %iger KCl kurz homogenisiert und dann in 2-Liter Aceton von -10° C eingeührt. Das Aceton wurde auf einem großen Büchner-Trichter abgesaugt und der Mitochondrienkuchen in 400 ml - 10° Aceton abermals zerkleinert und endlich in 300 ml peroxydfreiem Äther suspendiert, abgesaugt und dann rasch auf großen Filtrierbögen ausgebreitet und bei 0° mit einem schwachen Luftstrom getrocknet. Die trockenen Mitochondrien wurden in einen Exsiccator übergeführt und über konzentrierter Schwefelsäure im Vakuum bei -10° C aufbewahrt. 500 g Leber ergaben so ca. 15-20 g Mitochondrien. Der Ätherschritt wurde eingeführt, um das Trocknen der Mitochondrien zu erleichtern.

Das fettsäureaktivierende Enzym ("fatty acid activating enzym, FAAE, Octanoic thiokinase") wurde nach Mahler et al. (1953) aus den Lebermitochondrien gewonnen.

Das von Schachter und Taggart beschriebene "Activationenzyme", das sowohl das aktivierende Enzym wie auch die Glycin-N-Acylase enthält, konnte unter den bei Schachter und Taggart (1954) zitierten Bedingungen nicht dargestellt werden. Ein ähnliches Präparat, das sowohl FAAE als auch Glycin-N-Acylase enthielt, wurde dargestellt indem 25 g der Lebermitochondrien für 40 Minuten bei 0° mit 250 ml 0,02 molarer K_2HPO_4 extrahiert wurden. Das Unlösliche wurde durch Zentrifugieren bei $1600 \times g$ für 6 Min. entfernt und das Überstehende mit Ammoniumsulfat in der Kälte fraktioniert. Die Fällung, die zwischen 42 und 46 % Ammoniumsulfatsättigung auftrat, wurde auf einer Servall SSI-Zentrifuge in der Kälte bei $20\,000 \times g$ für 20 Min. abzentrifugiert und der Rückstand in 10 ml 0,02 m $KHCO_3$ aufgenommen und 3 Stunden gegen den selben Puffer (7 Liter) bei 0° C dialysiert. Das Dialysat wurde auf 20 ml mittels 0,02 m $KHCO_3$ -Lösung aufgefüllt. Das Präparat enthielt 24 mg Protein pro ml und enthielt genügend Glycin-N-Acylase, sodaß dieses Enzym bei der Synthese von IES zu Indolaceturssäure niemals limitierend war. Diese Fraktion wird forthin Am_{46} genannt.

Pyrophosphatase wurde nach der Beschreibung von Heppel (1955) aus "Fleischmanns Hefe" bereitet. Das Präparat hatte eine spezifische Aktivität von 55 000 Heppel-Einheiten pro mg und war frei von AMP-ase und ATP-ase.

Adenosinmonophosphatase wurde nach der "simplified method" von Heppel und Hilmo (1951) aus Bullensamenplasma bereitet, das Präparat besaß eine Aktivität von 655 Heppel-Einheiten pro ml und war frei von ATP-ase.

Hexokinase war ein käufliches Präparat der Sigma Chemical Company.

Tierisches Protein wurde mittels der turbidimetrischen Methode mit Trichloressigsäure nach Kunitz (1952), pflanzliches Protein mittels der Biuret Methode (Layne 1957) bestimmt. Als Standard diente in beiden Fällen kristallines Albumin aus Rinderserum.

Zur quantitativen Bestimmung von Indolacetursäure wurde die von Chantrenne (1955) ausgearbeitete Methode für Hippursäure leicht modifiziert übernommen. Das Peptid wurde aus dem schwefelsauren entproteinisierten Enzymansatz durch dreimaliges zweiminütiges Ausschütteln mit je 2,5 ml eines Gemisches aus 1 Vol. n-Butanol und 5 Vol. Chloroform isoliert. Die Proben wurden jeweils zentrifugiert, die organische Phase abgesaugt und filtriert um Spuren von Wasser zu vermeiden. Der Filter wurde abermals mit Extraktionsflüssigkeit gewaschen und die vereinigten Filtrate in ein Wasserbad von 80-90° C eingehängt und das Lösungsmittel durch Einblasen von Luft vertrieben. Der trockene Rückstand wurde in 2 ml 2 n KOH aufgenommen, das Reagenzglas mit Aluminiumfolie verschlossen und 3 Stunden im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Nach 3 Stunden wurde abgekühlt, ein Tropfen 0,1 % Bromcresolpurpur dem Hydrolysat zugefügt und mit 5 m H₂SO₄ und 1 m KOH den Indikator zum blaugelben Umschlagston gebracht. Der Inhalt wurde in ein kleines Destillationskölbchen übergeführt und das Reagenzglas mit 1 ml Wasser nachgewaschen, 1 ml Ninhydrinphosphatpufferlösung (5 g Ninhydrin, 3,5 g K₃PO₄, 20 g KH₂PO₄/100 ml Wasser) zugegeben nebst einer Spatelspitze Bimssteinpulver. Der Inhalt wurde, nachdem die Kölbchen an die Schliffe gedreht waren, in einem auf 140° vorgeheiztem Finolbad destilliert. Die Destillation nahm ungefähr 20 Min. in Anspruch. Das Destillat wurde mit 5 ml konzentrierter Schwefelsäure unter Kühlung versetzt und anstelle von Chromotropsäurelösung wurden 0,2 ml einer 7 %igen Lösung des Natriumsalzes von 4,6 Dihydroxynaphthalen 2,7 disulfonsäure zugefügt. Die Reagenzgläser wurden daraufhin 30 Min. im Dunkeln auf 100° erwärmt und die entstandene violette Farbe bei 570 mμ nach dem Abkühlen in einem DU Spektralphotometer der Fa. Beckmann abgelesen. Eine Eichkurve wurde mit verschiedenen Mengen Hippursäure aufgestellt, die den Enzymanätzen zugefügt wurden.

Pyrophosphat wurde nach 2 Methoden bestimmt. a) Dem enzymatischen Ansatz wurde im Überschuß Pyrophosphatase zugesetzt und nach Abstoppen der Reaktion Orthophosphat nach der Methode von Kunitz (1951) bestimmt. Das reduzierende Gemisch wurde durch die Mischung von Fiske und Subbarow (1925) ersetzt. Es

wurde gegen einen Blindwert verrechnet, in dem die zu aktivierende Säure nicht zugesetzt war. b) Nach der Methode von Flynn et al. (1954), wobei die Eichkurve unter Zusatz von jeweils 2 μM ATP aufgestellt wurde. In jeder Versuchsreihe wurden interne Pyrophosphat-Standardproben mitgeführt. Die Messung erfolgte in jedem Falle an einem Beckmann DU-Spektrophotometer.

Sulfhydrylgruppen wurden nach Mahler et al. (1953) an 0.2 ml-Proben bestimmt, jedoch wurde das Kochsalz, Soda, Nitroprussidgemisch der enzymatischen Probe zugesetzt und nicht umgekehrt. Die sich ergebende rote Farbe wurde 30 Sekunden nach Zugabe des Gemisches in einem "Spectromic 20" Bausch und Lomb-Spektrophotometer bei 520 $\text{m}\mu$ gemessen. Unter diesen Bedingungen ergaben 0,25 μM -SH-Gruppen eine Extinktion von 0,625 Einheiten. Glutathion diente als Standard.

IES wurde quantitativ mit dem Salkowskireagenz nach Tang und Bonner (1947) bestimmt. Die Proben wurden nach Zugabe des Reagenz und Durchmischung 30 Minuten im Dunkeln aufbewahrt und dann bei 520 $\text{m}\mu$ im DU-Spektralphotometer gemessen. 0.1 μM IES ergaben eine Extinktion von 0,290 DU-Einheiten.

Indolacetyl-Adenosinmonophosphat (IES-AMP) wurde in ähnlicher Weise bestimmt. Da IES-AMP in polaren Lösungsmitteln unlöslich ist, konnte IES leicht von dem Anhydrid abgetrennt werden, welches dann durch Zugabe von Salkowskireagenz quantitiert wurde. Die Extinktion von IES und IES-AMP war mit Salkowskireagenz bei 520 $\text{m}\mu$ dieselbe, d.h. vor und nach alkalischer Hydrolyse von IES-AMP ergab sich derselbe kolorimetrische Wert.

Die mit HClO_4 (7 % Endkonzentration) enteiweißte Probe (1 ml) wurde in ein 5 ml konisches Zentrifugenglas mit eingeschliffenem Stöpsel eingefüllt, gekühlt und mit 2.5 ml eiskaltem Essigester versetzt. Das Glas wurde 15 Sekunden manuell heftig geschüttelt, gekühlt, abermals 15 Sekunden geschüttelt und dann 30 Sekunden zentrifugiert. Mit einer Kapillare, die an einer Wasserstrahlpumpe angesetzt war, wurde die organische Phase abgesaugt und die Extraktion abermals wiederholt. Danach wurden in das Zentrifugenglas 4 ml Salkowskireagenz einpipettiert, der Inhalt vermischt und der Farbe erlaubt sich 30 Minuten im Dunkeln zu

entwickeln. Als Eichkurve wurde eine entsprechende Kurve mit IES aufgestellt.

An Puffern wurde verwendet: für pH 1-2 KCl/HCl, für pH 3-8 Zitronensäure/ Na_2PHO_4 , für pH 8.5-10.5 Na_2CO_3 / NaHCO_3 . Alle Puffer wurden nach Tabellen von Gomori (1955) angemacht und auf ihren End-pH hin kontrolliert.

Für Indolacetyl-Coenzym A (IES-CoA), das erwartungsgemäß auch in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich ist, wurde ein ähnlicher Test verwendet. 1 ml der enteiweißten Probe wurde bei Zimmertemperatur (wegen der größeren Säurestabilität von IES-CoA) mit 2×2.5 ml Essigester hintereinander ausgeschüttelt, zentrifugiert, der Essigester jeweils abgesaugt und schließlich die Probe mit 4 ml Salkowskireagenz versetzt. Die sich entwickelnde violettblaue Farbe von IES-CoA wurde nach 9 Minuten bei 560 m μ mit einem DU-Spektrophotometer abgelesen. Eine Eichkurve für den Thioester wurde mit Indolacetylpantetheine aufgestellt (Zenk 1958). 0.1 μm gaben dabei eine Extinktion von 0.180 Einheiten.

Hydroxylamin wurde nach der Methode von Frear und Burrell (1955) bestimmt, im Beckmann DU-Spektrophotometer bei 705 m μ gemessen und gegen Eichkurven verrechnet.

Als Chromatographiergemische wurden hauptsächlich die zwei Lösungsmittel, die von Good et al. (1956) angegeben wurden, verwendet.

Lösungsmittel A: 80 Teile Isopropylalkohol zu 20 Teilen
8 n Ammoniaklösung (v/v)

Lösungsmittel B: 80 Teile Isopropylalkohol 1.25 % Essigsäure
enthaltend zu 20 Teilen einer 20 %igen
wässrigen Lösung von Ammonacetat.

Ehrlichreagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd) wurde nach Sen und Leopold (1954) bereitet. Indolacetyl-glycin wurde nach Wieland und Hörlein (1955) dargestellt, ebenso Indolthioessigsäure (Fp 84-85° C; W u. H geben 86-87° C an).

IES-Asparaginsäure wurde durch Umsatz von IES-AMP mit einem Überschuß Asparaginsäure bei pH 8 gewonnen und chromatographisch gereinigt; dabei war im Gegensatz zu der Umsetzung mit dem gemischten Anhydrid der IES lediglich eine Bande zu erkennen, die mit den angegebenen R_f -werten (Andreae und Good 1957) für synthetisch dargestellte IES-Asparaginsäure (Good 1956) übereinstimmte.

Alle chlorierten Phenoxyssäuren waren Geschenke der American Paint Company für die herzlich gedankt wird. IES, Naphthyl-essigsäure (NES) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) sowie die meisten gebräuchlichen Chemikalien wurden von Eastman Kodak Co. bezogen. Die Kaliumsalze der Säuren wurden durch Lösen der entsprechenden Säure in absolutem Methanol und Zugabe einer konzentrierten methanolischen KOH-Lösung dargestellt, dabei fielen die Kaliumsalze aus und wurden durch Filtration isoliert und aus heissem Methanol rekristallisiert.

ATP als Dinatriumsalz und Trispuffer (Trishydroxymethylaminomethan Puffer) wurden von der Sigma Chemical Co. erworben. CoA (ca. 75 %ig) wurde von der Pabst Brewing Co. gekauft und ein mg einem μ m gleichgesetzt.

1 C^{14} Benzoesäure 2.5 mc/mMol wurde von Volk Radiochemical Co. bezogen, 1 C^{14} NES 1.25 mc/mMol von Tracerlab.

Die Bestimmung der Radioaktivität der Substanzen auf den Chromatogrammen als Impulse pro Minute (IPM) erfolgte mit Hilfe eines Großflächenzählrohres. Die gemessenen Werte wurden durch Subtraktion des Nullwertes des Gerätes korrigiert.

Spezielles Material

Darstellung von Hydroxamsäuren der 3 wichtigsten Auxine, 2,4-D, NES und IES.

Für die Darstellung der Hydroxamsäuren wurde jeweils von den entsprechenden Methyl oder Äthylester der Säuren ausgegangen. Die Umsetzung erfolgte nach der Beschreibung von Hauser und

Renfrow (1944) für Benzoylhydroxamsäure. Die Darstellung der Auxin-Hydroxamsäuren sei am Beispiel der 2,4-D-Hydroxamsäure aufgeführt.

2,4-D-Hydroxamsäure.

4.67 g $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ wurden in 24 ml CH_3OH heiß gelöst und nach dem Abkühlen eine Lösung von 5.61 g KOH in 14 ml CH_3OH unter Eiskühlung zugegeben. Das entstehende KCl precipitierte und nach 5-10 Minuten bei 0°C wurde es abfiltriert. Zu dem klaren Filtrat wurden 7.7 g gepulverter 2,4-D-Methylester (Geschenk der Dow Chemical Company durch Vermittlung von Prof. Dr.F.Warren) gegeben und völlig gelöst. Die klare Lösung wurde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 20 Minuten erfolgte bereits Kristallisation des Hydroxamates, nach einer Stunde hatte sich der Kolbeninhalt bereits verfestigt. Er wurde über Nacht stehen gelassen und dann abgesaugt, mit wenig Äthanol gewaschen und trocken gepumpt. Ausbeute am Kaliumsalz der 2,4-D-Hydroxamsäure 7.87 g = 87 % der Theorie. Nach Umkristallisation des Kaliumsalzes aus heissem Wasser und Lösen eines Teiles in heisser 1.25 n Essigsäure unter anschließendem Kühlen ergibt 2,4-D-Hydroxamsäure, die als weiße Nadeln kristallisiert. Fp: 143-144 $^\circ\text{C}$. Das Produkt ist schwer in Wasser löslich. Eine gesättigte Lösung enthält ca. 1.2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ an 2,4-D-Hydroxamsäure und gibt auf Zusatz von FeCl_3 Ionen im sauren Medium die typische Rotfärbung für Hydroxamsäuren.

Auf dieselbe Weise wurden

NES-Hydroxamsäure, weiße Nadeln Fp: 163-164 $^\circ \text{C}$
und das Kaliumsalz der IES-Hydroxamsäure als gelbliche Platten, die in H_2O gut löslich sind, gewonnen.

Die Farbentwicklung der IES-Hydroxamsäure mit Fe^{+++} Ionen folgte dem Beer'schen Gesetz zwischen 0,2 und 2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (Abb.1), jedoch tritt bei einer Anwesenheit von so geringen Mengen wie 0.02 μM freier IES eine starke Störung durch die Farbentwicklung von Fe^{+++} Ionen mit IES ein, daß der Test unbrauchbar wird. Das heißt, der Test kann nur unter Bedingungen verwendet werden, wenn das gesamte IES als IES-Hydroxamat vorliegt.

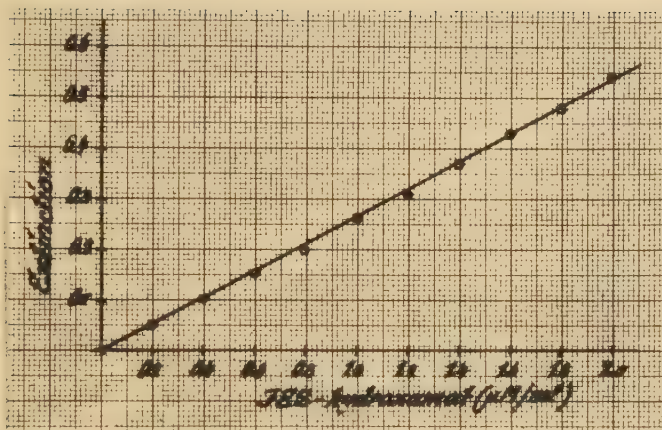
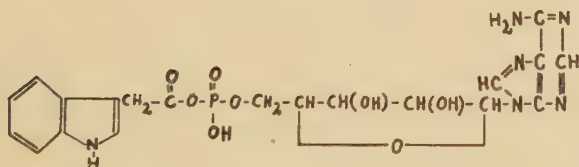


Abb.1. Die Eichkurve für IES-Hydroxamat wurde mittels des FeCl_3 -Testes nach Jones et al. (1953) bei 540 m μ mit dem Bausch und Lomb "Spectronic 20" aufgestellt.

Darstellung von Indolacetyladenosin Mono-
Phosphat (IES-AMP)



IES-AMP ist erstmalig im Rahmen dieser Untersuchungen von Zenk (1958) dargestellt worden. In jenem Verfahren wurde zur Knüpfung der Anhydridbindung Dicyclohexylcarbodiimid nach Talbert und Huennekens (1956) angewendet. Jedoch war die Ausbeute von IES-AMP unter diesen Bedingungen nur 42-46 %, und die hohe IES-Konzentration von 32 mmol IES gegenüber einem mmol AMP, die für diese Synthese erforderlich ist, ziemlich kostspielig. Daher wurde nach einem weiteren Verfahren zur Darstellung des Anhydrids gesucht. Moyed und Lipmann (1957) modifizierten die Reaktionsbedingungen von Avison (1955) und acylierten AMP mittels Propionsäureanhydrid unter Pyridinkatalyse. Das Material war ca. 90 %ig rein und wurde in den enzymatischen Experimenten ohne weitere Reinigung verwendet.

Da nun das Anhydrid von IES nicht bekannt ist, wurde der Versuch unternommen die Reaktion mit dem gemischten Anhydrid von IES, dem Indolacetyl-Carbonsäureethylester, in Tetrahydrofuran zu bewerkstelligen. Die Synthese verlief befriedigend, die Reinheit dieses Produktes lag in verschiedenen Ansätzen zwischen 85-90 %.

Synthese von IES-AMP.

660 μ M AMP wurden in 10 ml 40 %ig wässrigem Pyridin gelöst und 660 μ M festes Lithiumhydroxyd zugefügt. Das Ganze wurde in einem Eisbad auf 0° C abgekühlt und unter Kühlung mit einem Magnetrührer schnell gerührt. Dann wurde das gemischte Anhydrid nach Wieland und Hörlein (1955) aus 5mM IES in 13 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran zugefügt. Das Gemisch wurde 15 Minuten lang kräftig gerührt und dann 3/4 des Volumens des Ansatzes kaltes Wasser zugefügt. Die überschüssige IES sowie das Pyridin wurden durch 3 Ätherextraktionen mit 4 Volumen Äther entfernt und das Nucleotid durch die Zufügung von 15 Volumen Aceton (bei -10° C) gefällt und 2 Stunden in einem Eiskochsalzbad aufbewahrt. Die Fällung wurde dann hochtourig abzentrifugiert, abermals in Wasser aufgenommen und umgefällt. Nach abermaligem Stehen in der Kälte wurde abzentrifugiert und die weiße Fällung im Vakuum über P_2O_5 bei 0° C über Nacht getrocknet. Das IES-AMP wurde in Wasser aufgenommen und an verschiedenen Proben das Verhältnis IES (Salkowski-Test) zu Gesamt-AMP (Extinktion bei 259 m μ) als 0.85-0.9 : 1 bestimmt, was einer Reinheit des Produktes von 85-90 % in verschiedenen Präparaten entspricht. Das Verhältnis von IES, das mit dem Salkowski-Test bestimmt wurde, zur Anhydridbindung, die mit dem Hydroxamsäuretest bestimmt wurde, der wegen der Abwesenheit von freier IES anwendbar war, betrug genau 1 : 1, was darauf schließen läßt, daß sich das gesamte IES in Anhydridbindung befand. Der Versuch, IES-AMP von dem restlichen AMP mittels der von Berg (1956) angewandten Methode an Dowex 1 $\times$ 10 in der Chloridform abzutrennen schlug fehl. Wohl konnte das AMP mit 0.015 n HCl scharf begrenzt eluiert werden, jedoch das IES-AMP wurde außerordentlich langsam eluiert und ergab keinerlei Gipfel. Eine Erhöhung der Säurekonzentration kam wegen der Säurelabilität des Präparates nicht in

Frage. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Reinheit des IES-AMP für enzymatische Reaktionen genügte.

Eigenschaften von IES-AMP.

Das rohe IES-AMP wurde als Band auf Whatman Nr. 3-Papier aufgetragen und in einem Gemisch von Isobuttersäure : NH_3 : H_2O = 66 : 1 : 33 bei +2° C aufsteigend entwickelt. Die Adenin enthaltenden Banden wurden unter dem kurzwelligen Ultraviolett-Licht als "löschende" Bänder festgestellt. Es traten 2 Bänder auf, eines mit dem Rf-Wert von 0.45 (identisch mit AMP), ein anderes mit dem Rf-Wert 0.55. AMP oder die AMP-Gruppe wurden außerdem auch noch bequem mit dem Molybdatreagenz von Bandurski und Axelrod (1951) festgestellt. Dabei ergab das Band mit dem Rf 0.55 eine typische violette Farbe, sehr verschieden von dem reinen Blau des AMP-Flecks. Die violette Farbe kam durch Überlagerung der blauen Phosphatfarbe mit der roten Farbe des Indols, die sich gleichzeitig unter den Testbedingungen entwickelte, zustande. Beim Sprühen des Chromatogramms mit einer 12%igen alkoholischen Zimtaldehydlösung und Einhalten des Chromatogramms in eine HCl-Atmosphäre ergab das Band mit dem Rf 0.55 die typisch orange Farbe für Indolessigsäure, während kein weiterer Fleck auftrat. Der Anhydridcharakter der Verbindung mit dem Rf 0.55 wurde also durch die positive Molybdatreaktion auf gebundenes Phosphat nach saurer Hydrolyse auf dem Papier und die positive Indolreaktion mit dem Zimtaldehydreagenz demonstriert. Die Verbindung wurde außerdem mit neutralem wässerigen Hydroxylamin und Hydrazin inkubiert. Die Reaktionsprodukte auf Whatman Nr. 3-Papier aufgetragen und aufsteigend in dem Lösungsmittel B entwickelt und im Falle der Hydroxamsäure mit saurer Eisenchloridlösung gesprüht, wobei sofort ein tiefdunkelbrauner Fleck auftrat, der sowohl in Farbe als auch Rf ununterscheidbar von der mitgelaufenen Indolacetylhydroxamsäure Rf 0.55 war. Das Hydrazid wurde mit Ehrlichreagenz gesprüht und ergab den mit dem Standard identischen gelbgefärbten Fleck für IES-Hydrazid Rf 0.70.

Weiterhin wurde die Verbindung unter alkalischen Bedingungen leicht gespalten, wobei freies AMP und IES als Spaltprodukte durch Cochromatographie mit bekannten Säuren nachgewiesen wurden.

Die pH-Abhängigkeit der Spaltung ist in Abb. 2 gezeigt. Während die Verbindung bei saurem pH bei 37° C ziemlich stabil ist, wird sie unter den selben Bedingungen gespalten, wenn die Temperatur auf 100° C erhöht wird. Die alkalische Labilität bestätigt die Anhydridstruktur. Im Vergleich mit dem Benzoyl-adenylat (Kellermann 1958) erscheint IES-AMP wesentlich labiler und tendiert mehr zu der Stabilität der Fettsäureadenylate (Berg 1956 und Peng 1956).

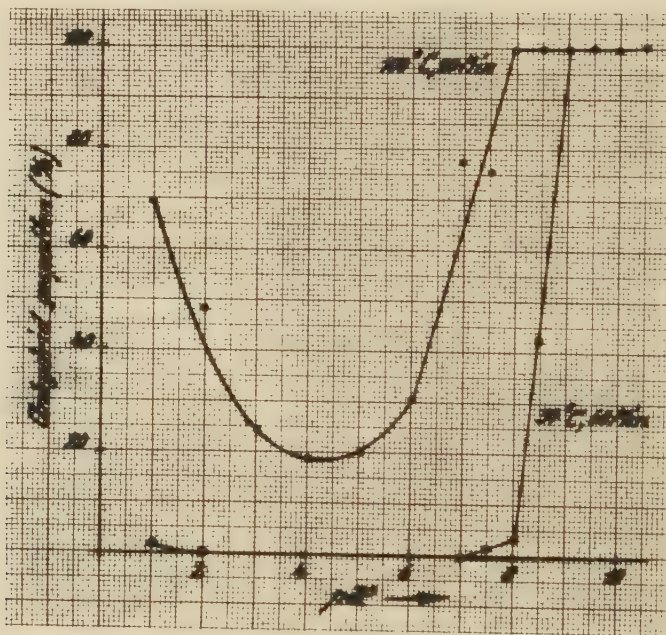


Abb.2. Hydrolyse von Indolacetyl-adenosinmonophosphat bei verschiedenen pH-Werten; (o) bei 100° C für 20 Min., (•) bei 37° C für 60 Min. System: 0.1 μ M IA-AMP, 20 μ M Puffer (siehe Material und Methoden), Volumen 1.0 ml.

Reaktion von IES-AMP mit Aminosäuren.

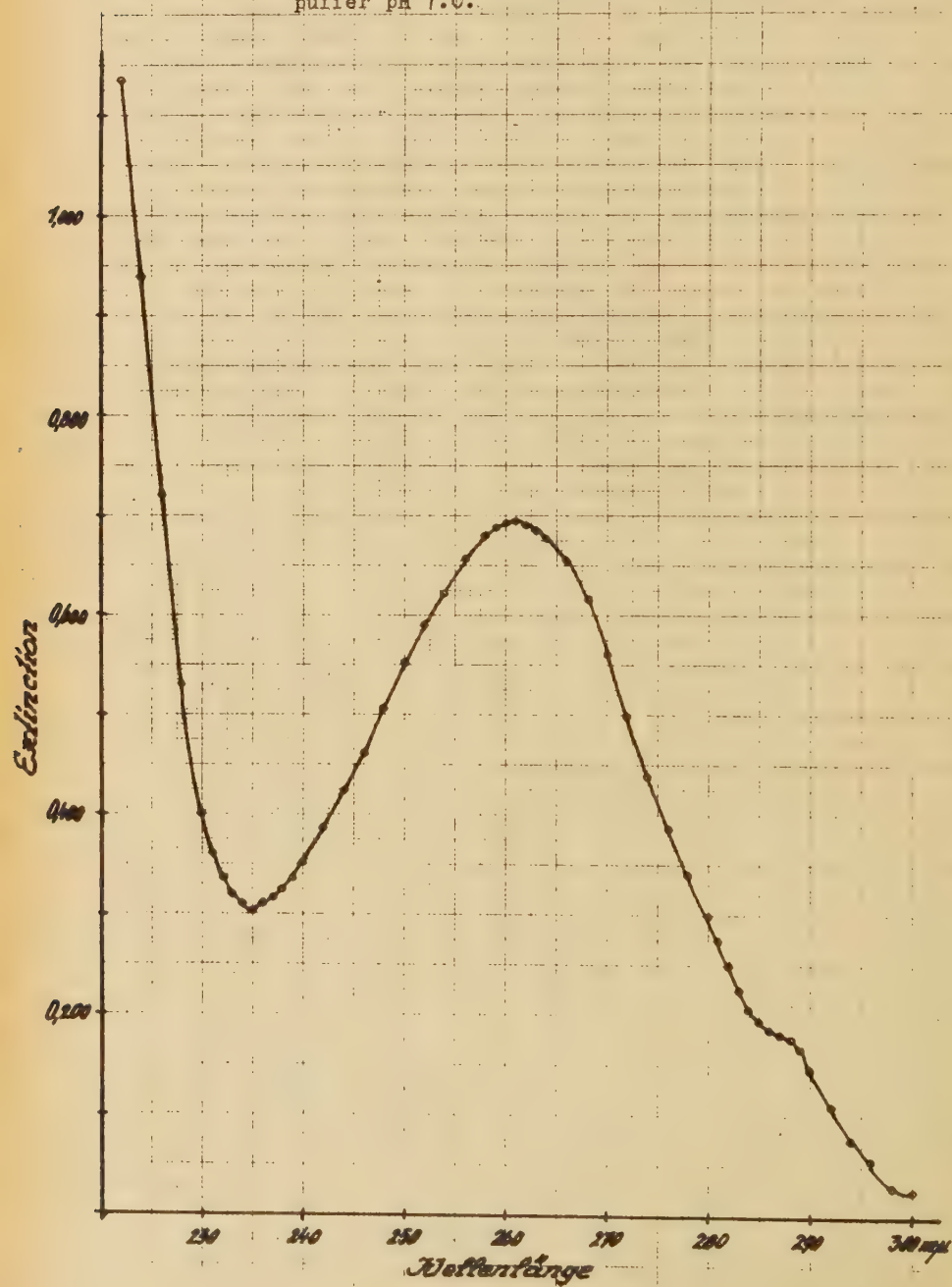
Es war von Interesse, ob IES-AMP seine Acylgruppe auf Aminosäuren und Mercaptane überführen kann. Daher wurden 0.1 μ M IES-AMP mit 10 μ M Glycin, Asparaginsäure, Cystein und N-Acetylcysteamin bei 37° C für 6 Stunden inkubiert. Die Reaktions-

produkte wurden im Lösungsmittel A chromatographiert. Indol-acetyl-Glycin Rf 0.46, N-Indolacetyl-asparaginsäure Rf 0.08, N-Indolacetylcystein 0.05 und S-Indolacetyl N-Acetylcysteamin Rf 0.86 konnten neben freiem IES Rf 0.40 mit dem Ehrlich-reagenz nachgewiesen werden. Die Acylübertragung steht ganz im Gegensatz zum Verhalten von Indolacetylphosphat, das seine Acylgruppe nicht auf Aminosäuren oder Mercaptane übertragen kann (Zenk 1958).

Absorptionsspektrum von IES-AMP.

Für die Aufnahme des Absorptionsspektrum wurde die Verbindung, nachdem sie vom restlichen AMP durch Papierchromatographie im Isobuttersäuregemisch bei +2° C abgetrennt war, direkt vom Papier bei 0° C eluiert und nach geeigneter Verdünnung und Zusatz von Phosphatpuffer (Endkonzentration M/10 pH 7.0) im DU-Spektralphotometer im UV-Bereich gemessen. Die Konzentration von IES-AMP war 0.017 $\mu\text{M/ml}$. Da sich das Spektrum mit dem Hydrolysat eines aliquots (0.02 m NaOH für 60 Minuten bei 37° C und Neutralisation im M/10 Phosphatpuffer pH 7.0) weitgehend deckte, der Gipfel bei 260 $\text{m}\mu$ dem Absorptionsgipfel von AMP nahezu identisch ist, kann der molare Absorptionskoeffizient der Verbindung wie im Falle des AMP mit $E = 15.4 \times 10^3$ bei 259 $\text{m}\mu$ (Morell und Book 1954) angegeben werden. Abb. 3 zeigt das UV-Absorptionsspektrum von IES-AMP mit dem Hauptgipfel bei ca. 260 $\text{m}\mu$, der der Absorption des Adenins entspricht. Daher ist es nicht möglich, daß das Acyl an der Aminogruppe des Adenins substituiert ist, da (Amino) N-Acetyladenin maximal bei 278 $\text{m}\mu$ (Kossel 1888, Wieland et al. 1956) absorbiert. Das Absorptionsspektrum von IES-AMP zeigt bei 288 $\text{m}\mu$ eine leichte Schulter, die durch die charakteristische Absorption von IES in diesem Bereich bedingt ist, da ja die Extinktion von AMP dort schon fast auf Null zurückgegangen ist. Das UV-Absorptionsspektrum zeigt nach alkalischer Hydrolyse keinerlei Veränderungen im Gegensatz zu Benzoyladenylat (Kellermann 1958), für das ein beträchtliches Differenzenspektrum (Maximum bei 240 $\text{m}\mu$) nach alkalischer Hydrolyse berichtet wurde.

Abb. 3. Ultraviolett Absorptionsspektrum von Indolacetyl-
adenosinmonophosphat (0.017 μ M/ml) in M/10 Phosphat-
puffer pH 7.0.



III. Ergebnisse

1) Enzymatische Aktivierung von Auxinen und Konjugierung mit Aminosäuren.

a) In vivo Synthese von Indolacetursäure.

Um die Jahrhundertwende konzentrierte sich das Interesse der biochemischen Forschung um Indolderivate. Der Ausgangspunkt dieses Interesses bildete der Küpenfarbstoff Indigo. Da im Harn relativ hohe Mengen an Indolderivaten neben der Muttersubstanz des Indigo dem Indoxyl vorkommen, wurde der Urin systematischen Untersuchungen über Indolderivate unterzogen. Im Jahre 1882 wurde beim Zusetzen von Mineralsäure zu Harn ein neuer Farbstoff das Urorosein entdeckt. Die Muttersubstanz dieses Farbstoffes ist IES oder die daraus durch Konjugation mit Glycin hervorgegangene Indolacetursäure.

Die Indolacetursäure tritt in gesteigertem Maße nach Verfütterung von Tryptamin oder besser IES an Hunde im Harn auf und wurde 1913 von Ewins und Laidlaw daraus als kristallisierte Verbindung isoliert. Die Indolacetursäure wurde kürzlich von Wieland und Hörlein (1955) chemisch synthetisiert.

Zunächst sollte getestet werden, ob Indolacetursäure auch im isolierten Tierorgan gebildet wird. Dazu wurden Rattennieren sofort nach dem Töten des Tieres mit Hilfe eines Rasiermessers in 0.5-1 mm dicke Scheibchen geschnitten, mit isotonischer KCl-Lösung gewaschen und je 1 g Gewebe in ein 50 ml-Erlenmeyerkölbchen eingelegt das 10 ml einer Lösung von 0.0025 m IES, 0,2 % Glucose, 0.01 m Phosphatpuffer pH 7.5 und 0.154 m KCl enthielt. Durch die Lösung wurde Sauerstoff geperlt und das Gefäß mit einem Wattebausch geschlossen und in einem umgebauten Warburg-Apparat für 4 Stunden bei 37° geschüttelt. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 0.1 ml 30 %ige HClO_4 unterbrochen, wobei sich das Gewebe verfärbte. Das Gefäß wurde noch 5 Minuten lang weiter geschüttelt und dann die Flüssigkeit in einen Kutscher-Steudel-Extraktionsapparat überführt, 5 Stunden mit Äther extrahiert, die Ätherphase verdampft und der Rückstand mit Aceton aufgenommen und im Lösungsmittel A

auf Whatman-Nr.1-Papier chromatographiert. Das Chromatogramm wurde mit Salkowskireagenz gesprüht. Dabei ergaben sich folgende Flecken:

		synthetisch	Ätherrückstand
IES-Glycin	Rf	0.6	0.64
IES	Rf	0.67	0.72
Substanz X	Rf	-	0.88

Beide Flecken für Indolacetursäure zeigten die gleiche Geschwindigkeit der Farbentwicklung (1-2 Stunden) während IES schon nach 20 Minuten das Maximum erreicht, außerdem stimmten sie noch mit der bläulichroten Farbe der Peptide überein, während IES nach dem Sprühen kirschrot erscheint. Die schnelllaufende Substanz wurde nicht identifiziert.

b) Enzymatische Aktivierung von Auxinen unter Pyrophosphatabspaltung von ATP.

Daß die Aktivierung von Essigsäure in Hefe und tierischem Gewebe über die Pyrophosphatabspaltung aus ATP läuft, wurde erstmalig von Lipmann's Arbeitskreis (Jones et al. 1952, Jones et al. 1953) gefunden. Der Reaktionsmechanismus wurde daher folgendermaßen postuliert:



Daß dieser Mechanismus grundsätzlich für Fettsäuren auch mit längerer Kohlenstoffzahl (C 3-13) gelten soll, wurde durch die Arbeiten von Mahler et al. (1953) durch die Isolierung des Fettsäuren aktivierenden Enzyms festgestellt. Sie fanden darüberhinaus, daß auch einige aromatische Säuren, wenn auch wesentlich schlechter, so doch aktiviert werden. Chantrenne (1951) machte die Beobachtung, daß eine lösliche Enzympräparation aus einem Acetonpulver von Rattenleber die Synthese von Hippursäure ausführen kann, wenn man sie mit Glycin, Benzoesäure, ATP und Magnesium inkubiert. Entzieht man dem Enzym alles CoA durch Behandlung mit Dowex 1 Cl⁻ so läuft die Reaktion nicht mehr ab, wird aber durch von außen zugeführtes CoA wieder in Gang gesetzt. Diese CoA- und ATP-Ab-

hängigkeit ließ nach der Ermittlung der Konstitution der "aktivierenden Essigsäure" durch Lynen et al. (1951) vermuten, daß die Hippursäuresynthese über Benzoyl-CoA als Zwischenprodukt verläuft. Schachter und Taggart (1953) synthetisierten Benzoyl-CoA und fanden, daß das Acyl des Thioesters auf Glycin durch ein Enzym einer Schweinenierenfraktion übertragen werden kann. Schachter und Taggart vermuteten, daß es sich bei dem aktivierenden Enzym um FAAE handeln könnte, zumal sie in einer späteren Studie (S.u.T. 1954) fanden, daß auch höhere Fettsäuren mit Glycin gepaart werden konnten, was also deren Aktivierung voraussetzte. Als bequemen Test für die Aktivierung und Konjugierung quantitierten sie das abgespaltene Pyrophosphat. Dabei fanden sie auch, daß in ihrem Testsystem zwei heterocyclische Säuren, nämlich α -Picolinsäure und Nicotinsäure unter Konjugierung mit Glycin aktiviert wurden. Wir gingen daher daran, verschiedene aromatische Auxine, besonders den Heterocyclus IES daraufhin zu testen, ob das FAAE in der Lage ist, sie zu aktivieren.

Säure	μM PP freigesetzt
IES	0.27
NES	0.17
2,4-D	0.05
Phenoxyacetat	0.45

Tab.1. Freisetzung von anorganischem Pyrophosphat aus ATP durch die Aktivierung des Kaliumsalzes verschiedener Auxine. Das System enthielt: 5 μM der angegebenen Säure, 100 μM Tris $\times$ HCl Puffer pH 7.6, 3 μM MgCl_2 , 1 μM KBH_4 , 3 μM ATP, 0.25 μM CoA, 350 μg FAAE, (= Standard-incubationsgemisch) 120 Heppel-Einheiten Pyrophosphatase, in einem Gesamt-Volumen 1 ml, Temperatur 37° C, Versuchsdauer 60 Minuten.

Tabelle 1 zeigt, daß sowohl die heterocyclische IES als auch NES und die Säuren aus der Phenoxyreihe aktiviert werden. Es wird auch hier schon deutlich, daß die Chlorierung in der Phenoxyreihe die Aktivierung herabmindert. Als Produkt dieser Umsetzung sind die CoA-Thioester der verschiedenen Auxine zu erwarten. Abb. 4 sollte zeigen, ob die Menge an freigesetztem Pyrophosphat der Menge an eingesetztem Enzym proportional ist.

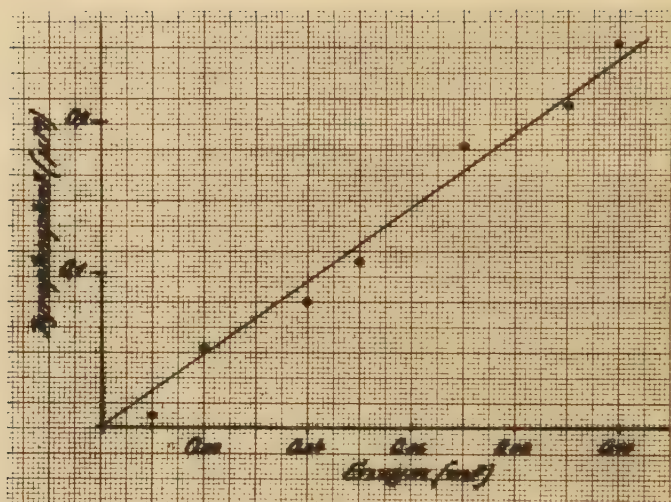


Abb. 4. Pyrophosphat Abspaltung aus ATP während der Aktivierung von IES mit steigenden Mengen Enzym (0.1 ml = 350 μ g Protein). (Standardinkubationsgemisch wie in Tab. 1)

Der Versuch wurde nach obigem Ansatz (Standardinkubationsgemisch) mit IES ausgeführt und gegen Blindwerte verrechnet, denen sowohl IES aber nicht Pyrophosphatase zugesetzt war, nebst einigen Proben, denen das Substrat fehlte und Pyrophosphatase zugesetzt war. Der Versuch zeigt, daß die Pyrophosphatabspaltung linear zur Menge an Enzym verläuft und somit die Abspaltung von Pyrophosphat aus ATP als Hinweis der Aktivierung der Carboxylgruppe der IES durch das Enzym in Anlehnung an obige Formulierung wahrscheinlich ist.

c) Aktivierung von Phenoxysäuren mit verschiedener Chlorierung.

Zu einem der interessantesten Probleme der Biologie gehört die Beziehung zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität. Seit der Entdeckung verschieden substituierter Phenoxysäuren und deren Wirksamkeit auf Pflanzen durch Zimmermann und Hitchcock (1942) ist das Interesse über die Wachstumseigenschaften von substituierten Auxinen stark angewachsen. Es ist bekannt, daß ortho-Chlorphenoxyessigsäure im Erbsenkrümmungs-

test schwach wirksam ist, während para- und meta-chlorierte Phenoxyessigsäuren stark wirken. 2,6 Dichlorphenoxyessigsäure hat im Gegensatz zu 2,4-D keine, 3,5 Dichlorphenoxyessigsäure nur schwache Wirksamkeit. Auch ist 2,4,5 Trichlorphenoxyessigsäure ebenso wirksam wie 2,4-D, während 2,4,6 Trichlorphenoxyessigsäure unwirksam ist. Muir et al. (1949) gesselten den damals noch geltenden Postulaten für Stoffe mit Auxineigenschaften, nämlich ein ungesättigtes Ringsystem mit Seitenkette, die eine Carboxylgruppe trägt und mindestens 1 Kohlenstoffatom vom Ring entfernt ist, sowie daß die Seitenkette in Nachbarschaft zu einer Doppelbindung im Ring stehen muß, ein drittes Postulat hinzu, daß eine aktive Phenoxyssäure eine freie oder wenigstens potentiell freie Orthoposition haben muß.

Es ist bekannt, daß orthosubstituierte Benzoesäuren schwer dazu zu bringen sind, Ester zu bilden, während anders substituierte Säuren keine Schwierigkeit in der Esterbildung zeigen (vgl. Fieser u. Fieser 1954), was eine eigenartige Parallele zu dem Postulat von Muir et al. darstellt. Es interessierte uns daher, ob die enzymatische Thioesterbildung von chloresubstituierten Phenoxyessigsäuren die biologischen Befunde bestätigt. Schachter und Taggart (1954) hatten bereits o,m,p-substituierte Benzoesäuren auf ihre Aktivierung und Konjugierung mit Glycin hin untersucht und hatten feststellen können, daß para- und meta-Substituierung (Hydroxy- und Amino-Gruppen) keinen Einfluß auf die Aktivierung ausüben, während die orthosubstituierten Benzoesäuren keinerlei Aktivierbarkeit zeigen.

Der Test wurde in dem Standardinkubationsgemisch ausgeführt, wobei die Pyrophosphatabspaltung aus ATP als Maß der Aktivierung galt. Jeder Ansatz wurde dreimal mit je 2 Parallelen ausgeführt, wobei der Trend der Aktivierung derselbe war.

Es zeigte sich dabei (Tab.2), daß die Monochlorierung der Phenoxyssäure gleichgültig in welcher Position die Aktivierung durch ATP und CoA auf etwa 57 % bezogen auf Phenoxyessigsäure herabdrückt, während Disubstituierung die Aktivierung noch stärker beeinflußt. Für 2,4-D, 2,6-D, 3,4-D und 3,5-D ist die Aktivierung verglichen mit Phenoxyessigsäure auf ca. 10 % ab-

Säure	PP	% von PES
PES	0.43	100 %
2-Cl "	0.23	54 %
3-Cl "	0.25	58 %
4-Cl "	0.26	60 %
2,3D-Cl "	0.17	40 %
2,4D-Cl "	0.05	12 %
2,5D-Cl "	0.10	23 %
2,6D-Cl "	0.03	7 %
3,4D-Cl "	0.06	14 %
3,5D-Cl "	0.04	9 %

PES = Phenoxyessigsäure

Tab.2. Pyrophosphat Freisetzung als Maß für die Aktivierung von verschieden chlorierten Phenoxyessigsäuren im Standardtest.

gesunken, während 2,3-D und 2,5-D etwas höhere Aktivierung erreichen. Grundsätzlich stimmen diese Ergebnisse nicht mit den Befunden von Schater und Taggart (1954) überein, was aber ohne Zweifel an der Verschiedenartigkeit der Substituenten oder der Seitenketten liegt. So kann in diesem Zusammenhang Thimann (1952) zitiert werden: "Hydroxylgroups which strongly activate the ring, invariably reduce auxin activity. ... On the other hand, halogen atoms which clearly confer auxin activity, are known actually to deactivate the ring some what; and the auxin activity of chloride compounds must be due largely to their resonance which has the effect of concentrating the reactivity of the ring at certain points." Möglicherweise hängt die Verhinderung der enzymatischen Aktivierung bei den ortho OH und NH₂ substituierten Benzoesäuren mit der starken Aktivierung des Ringes zusammen. Jedenfalls läßt sich in der Phenoxyessigsäurereihe kein Zusammenhang zwischen Aktivierung und Auxinwirksamkeit erkennen. Jedoch wird mit steigender Anzahl der Substituenten die Aktivierungsgeschwindigkeit vermindert, (bei 2,4,5 und 2,4,6 Trichlorphenoxyessigsäure liegt die Aktivierung ebenfalls um 10 % von der der Phenoxyessigsäure) was wie in den anderen Fällen auf sterische oder elektronische Faktoren zurückzuführen ist.

d) Konjugierung von Auxinen mit Glycin.

Eine biologisch sehr bedeutsame Acylierung der Aminosäuren liegt in den Entgiftungsmechanismen von tierischen und pflanzlichen Organismen. Aromatische Säuren, wie z.B. bei Pflanzenfressern die Benzoessäure, die sich zu toxischen Konzentrationen anreichern würden, werden mit Glycin gepaart und als die sogenannte Hippursäure ausgeschieden. Wie erwähnt wurde schon frühzeitig Indolcetyl-glycin, die Indolacetursäure im tierischen Harn erkannt. Als weitere Indol-Konjugationsprodukte sind bekannt geworden: Indolacetylglutamin im Menschen (Jepson 1956), Indolpropionylglycin (Decker 1957), Indolacryloylglycin (Kimming et al. 1958) und bei Pflanzen Indolacetyl-asparaginsäure (Andreae und Good 1955). Für die Bildung dieser Peptide muß eine Energiehebung der Carboxylgruppe erfolgen, die die Konjugierung mit der Aminosäure erlaubt. Daß diese energetische Hebung, Aktivierung, im Falle der Benzoessäure über Benzoyl-CoA geschieht, war nach dem analogen Beispiel der "aktivierten Essigsäure" (Lynen et al. 1951) naheliegend. Für eine ganze Reihe weiterer aromatischer und aliphatischer Säuren konnten Schachter und Taggart (1954) die Aktivierung und Konjugierung mit Glycin feststellen. In unserem Falle sollte nun untersucht werden, ob die 3 bekanntesten Auxine IES, NES und 2,4-D ebenfalls mit Glycin konjugiert werden, nachdem deren Aktivierung oben nachgewiesen war. Es wurde wieder der Standardtest unter Zufügung von 50 μ M Glycin unter Auslassung der Pyrophosphatase durchgeführt. FAAE wurde durch 1 mg Protein der Am₄₆Fraktion ersetzt.

System	R-Acetursäure (μ M)
IES	0.904
- ATP	0.105
- CoA	0.00
2,4-D	0.00
NES	0.00

Tab.3. Konjugierung verschiedener Auxine mit Glycin unter Bildung von Acetursäuren (System siehe Text).

Tabelle 3 zeigt, daß IES also nicht nur aktiviert sondern auch mit Glycin konjugiert wird. Die Reaktion war ATP-abhängig (die

geringe Indolaceturbildung bei ATP-Abwesenheit ist wahrscheinlich auf proteingebundenes Nucleotid zurückzuführen). Das System war CoA-abhängig. 2,4-D und NES wurden überraschenderweise nicht meßbar mit Glycin gekoppelt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Versuchen von Tanaka (1940), der bei Verfütterung von IES und NES an Ratten fand, daß wohl IES eine Acetursäure bilioet, während NES unverändert im Harn ausgeschieden wurde.

Die Abhängigkeit der Peptidbindung vom CoA konnte durch die Verfolgung der Kinetik der Indolacetursäurebildung in Ansätzen mit und ohne CoA gezeigt werden. Um jede Spur von CoA aus der Enzymlösung zu entfernen, wurden 23 mg der Am_{46} Fraktion in 2.1 ml Wasser für 15 Minuten mit 1 g Dowex 1 $\times$ 10 200-400 mesh in der Chloridform magnetisch bei 0° C gerührt, der Austauscher abzentrifugiert und das Überstehende benutzt. Verwendet wurde das Standardinkubationsgemisch, wobei in einer Serie CoA ausgelassen wurde. 1 mg Dowex-behandeltes Protein der Am_{46} Fraktion diente als Enzym (Abb. 5).

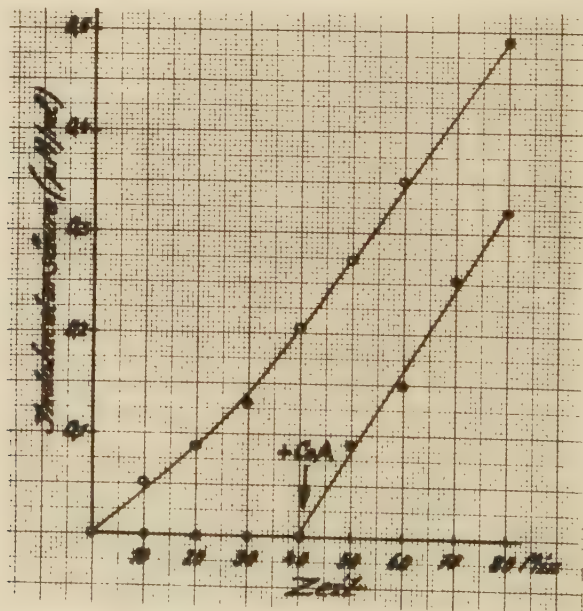


Abb. 5. Abhängigkeit der Indolacetursäure Bildung von der Anwesenheit von CoA. System: 5 μ M Kaliumsalz der IES, 100 μ M Trispuffer $\times$ HCl pH 7.6, 3 μ M $MgCl_2$, 1 μ M KBH_4 , 6 μ M ATP, 1 mg der Am_{46} Fraktion, (o) 0.25 μ M CoA am Anfang zugesetzt, (•) 0.25 μ M CoA nach 40 Min. zugesetzt. Gesamt-Volumen 1.0 ml Inkubationstemperatur 37° C.

Das Experiment zeigt eindeutig die Abhängigkeit der Reaktion von der Anwesenheit des CoA, wodurch die Natur des energiereichen Zwischengliedes in der Indolacetursäuresynthese als Indolacetyl-CoA indirekt bewiesen ist.

e) Der Einfluß von Hydroxylamin auf die enzymatische Synthese von Indolacetursäure.

Geeignete Carboxylsäurederivate reagieren mit neutralem oder alkalischem Hydroxylamin unter Formung von Hydroxamsäuren. In dieser Weise reagieren sowohl Säurechloride, Ester, Amide, Anhydride als auch Laktone (Goddu et al. 1955). Die nachfolgende Reaktion der gebildeten Hydroxamsäure mit Eisenionen im sauren Milieu wurde zum Nachweis der Hydroxamsäuren verwendet (vgl. Feigl 1954).

Im Jahre 1945 gelang es Lipmann und Tuttle zu demonstrieren, daß auch Acylphosphate mit Hydroxylamin reagieren und die Bildung der Hydroxamsäure bequem zu einer quantitativen Mikromethode ausgearbeitet werden kann. Im folgenden gewann dieser Test eine hervorragende Bedeutung, zumal die Bildung von Hydroxamsäure auch im enzymatischen Ansatz erfolgte und die Reaktion nicht nur mit Acylphosphaten sondern auch mit Acyl-CoA-Derivaten (Beinert et al. 1953) und mit Acyladenylaten (Berg 1956) erfolgt.

Mahler et al. (1953) berichten, daß Hydroxylamin (nicht entsalztes !) in einer 1 molaren Konzentration, die für eine Reaktion mit dem Acyl-CoA nötig sei, auf das PAAE hemmend wirkt, und daher ungeeignet als Test für das aktivierte Acyl sei. Kellerman (1958) berichtet, daß in einem p-Aminohippursäure synthetisierenden System aus Kaninchenleber die Peptidsynthese sogar bei 2 m NH_2OH Konzentration weiterläuft und kein klarer Beweis für die Bildung von p-Aminobenzoehydroxamsäure vorhanden war. Diese Befunde waren insofern wichtig, als die Verwerfung der ursprünglichen Theorie von Leopold und Guernsey (1953), daß Auxin mit CoA verestert wurde, durch Leopold und Price (1956) darauf beruhte, daß Veresterung von Auxin (NES) mit CoA mittels des Hydroxamsäuretestes (nach Jones et al. 1953) geprüft wurde, ebenso wie die etwaige Hemmung der Acetyl-CoA-Bildung durch Auxin.

Es sollte daher hier geprüft werden, ob Hydroxylamin die aktivierte IES abfangen kann und welche Konzentration an Hydroxylamin für eine optimale Reaktion nötig ist. Als Testsystem wurde die Indolacetursäurebildung gewählt, da ja ein direkter Nachweis des Indolacetylhydroxamates mit Eisenionen wegen der Verfärbung, die IES schon in sehr geringen Konzentrationen unter diesen Bedingungen erleidet, nicht möglich ist. Dem Inkubationsgemisch wurden Glycin und steigende Mengen von salzfreiem Hydroxylamin (Beinert et al. 1953) zugesetzt und Indolacetylglycin auf die beschriebene Weise isoliert und quantitiert. Abb. 6 zeigt den Betrag an Peptid, der während der Inkubationszeit in Anwesenheit von Hydroxylamin gebildet wurde.

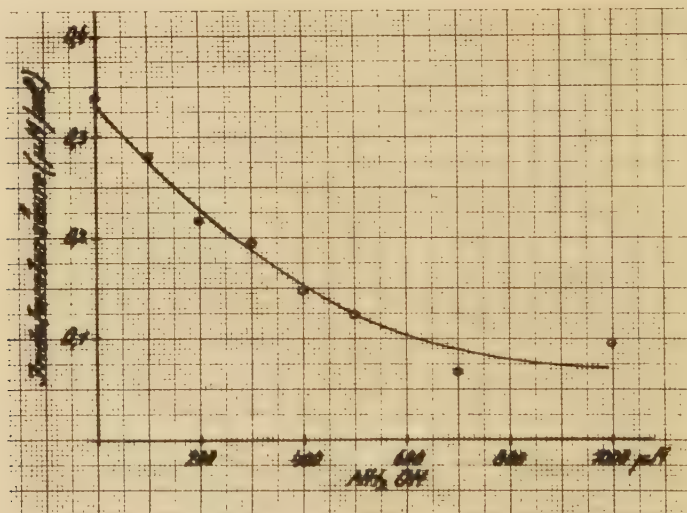
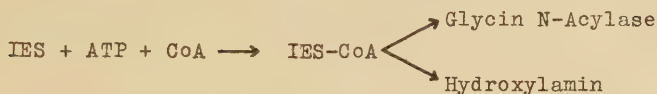


Abb. 6. Indolacetsäure Bildung in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen an Hydroxylamin. System wie in Abb. 5. Gesamt-Volumen 1.0 ml, Temperatur 37° C, Versuchsdauer 60 Min.

Es ist erstaunlich, daß bei einer so hohen Konzentration wie 1000 μM NH_2OH pro ml noch immer 23 % des gebildeten IES-CoA ihr Acyl unbehelligt auf Glycin abzugeben vermögen.

Der Vorgang kann folgendermaßen formuliert werden :



Daß der Acylrest des IES-CoA selbst bei hohen Hydroxylaminkonzentrationen auf Glycin übertragen wird, kann daran liegen, daß die Reaktion des Thioesters mit NH_2OH geschwindigkeitsbegrenzend ist und dadurch die Glycin N-Acylase zum Zuge kommt.

Ein Ansatz wurde im obigen Gemisch ohne Glycin und zunächst ohne Hydroxylamin 1 Stunde bei 37°C inkubiert (Gesamt-Volumen 0.9 ml), darauffolgend 1000 μm Hydroxylamin (0.15 ml) zugesetzt und für 3 Stunden bei 37°C weiter inkubiert. Mit Alkohol (Endkonzentration 60 %) wurde die Reaktion abgestoppt, das ausgefallene Protein abzentrifugiert, das Überstehende in vacuo eingeengt und ein aliquot im Lösungsmittel B von Good et al. (1956) aufsteigend chromatographiert. Eine Probe wurde mit 5 % Eisenchlorid in N/10 HCl auf dem Papier gesprüht, eine Parallelprobe mit Ehrlichreagenz. In jedem Falle ergab sich ein roter Fleck mit dem R_f 0.55, der in R_f und Farbton genau identisch mit der synthetischen Probe von Indolacetylhydroxamsäure war. Enzymatisch gebildetes IES-CoA kann also zu einem gewissen Teil mit NH_2OH unter Bildung von IES-Hydroxamsäure abgefangen werden. Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß der Hydroxamsäuretest unter den von Leopold und Price (1956) gewählten Bedingungen durch Zusatz von 0.2 m NH_2OH nicht als ausreichend angesehen werden kann, da unter diesen Bedingungen nur ca. 35 % des gesamten "Auxinyl-CoA" abgefangen werden können. Anstelle der Glycin-N-Acylase könnte in Pflanzen auch die sehr wirksamen Thiolasen treten, die mit dem NH_2OH in oben geschilderter Weise um das "Auxinyl-CoA" konkurrieren könnten. Selbst höhere Konzentrationen an NH_2OH (1-2 molar) würden keinen verlässlichen Test für die Aktivierung von aromatischen oder aliphatischen Karbonsäuren mit FAAE darstellen.

f) Isolierung von enzymatisch gebildetem IES-CoA.

Um IES-CoA wirklich als Produkte der Aktivierung beweisen zu können, sollte es aus den enzymatischen Ansätzen isoliert werden. Dazu wurden 5 μM IES, 100 μM Tris pH 7.6, 2 μM MgCl_2 , 6 μM ATP, 3 μM KBH_4 , 0.25 μM CoA und 500 μg FAAE in einem Gesamtvolumen von 1 ml für 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Mit Trichloressigsäure Endkonzentration 5 % wurde enteiweißt und das Überstehende von 10 Ansätzen vereinigt. Die sauren Ansätze wurden 3 x mit dem 1.5-fachen Volumen von Äther extrahiert, um überschüssiges IES zu entfernen und dann lyophilisiert. Das weiße Pulver, das zurückblieb, wurde mit 0.75 ml H_2O aufgenommen, von Trübungen in kleinen konischen Gläsern abzentrifugiert und das Überstehende in 1 inch breiten Banden wegen der relativ hohen Salzkonzentration auf Whatman Nr.3-Papier aufgetragen und in einem Gemisch von Äthanol : 0.1 M Natriumacetat (pH 4.5) 1 : 1 nach Stadtman (1952) aufsteigend chromatographiert. Seitlich lief chemisch synthetisiertes IES-CoA (Zenk 1958) mit. Nach dem Trocknen der Chromatogramme wurde die Hälfte des Papiers mit Salkowskireagenz gesprüht, wobei sich bei einem ungefähren R_f von 0.70 ein blavioletter geschwänzter Fleck ergab, der mit synthetischem IES-CoA in Farbe und R_f (0.73) übereinstimmt. Die andere Hälfte des Papiers wurde zunächst unter dem Ultraviolettlicht betrachtet, wo unter anderen "löschenden" Flecken auch ein schwacher mit dem R_f von 0.70 gesehen werden konnte. Mit dem Nitroprussidreagenz I von Toennies und Kolb (1951) veränderte dieser Fleck seine Farbe nicht, nach der Behandlung mit methanolischer KOH (Reagenz II) jedoch trat sofort eine deutliche Rotfärbung, wie sie für eine Thioesterbindung typisch ist, ein. Diese 3 Kriterien für IES-CoA, Blaufärbung mit Salkowskireagenz, UV-Licht "löschend" (Adenin) und positive Nitroprussidreaktion auf Thioester wurden von unserer Substanz erfüllt. Damit dürfte das Auftreten von IES-CoA durch enzymatische Synthese gesichert sein.

g) Kinetik der IES-CoA Bildung.

Um die Kinetik der IES-CoA-Bildung in direkter Demonstration zu verfolgen wurde IES zusammen mit FAAE im Standardinkubations-

gemisch für verschiedene Zeit inkubiert. Die Reaktion wurde mit HClO_4 (Endkonzentration 6 %) abgestoppt, die restliche IES mit Essigester quantitativ entfernt und der IES-Thioester mit Salkowskireagenz quantitiert.

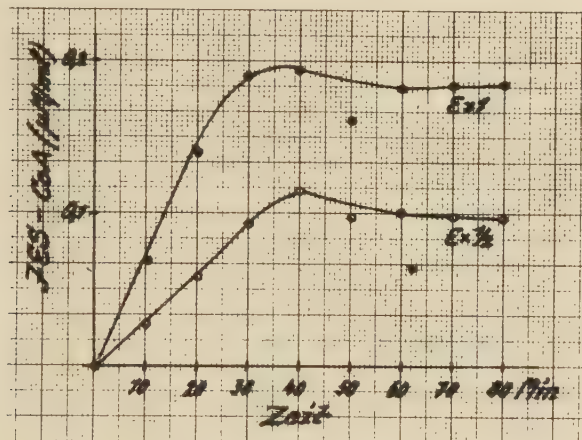


Abb. 7. Kinetik der IES-CoA Bildung. System: 5 μM Kaliumsalz der IES, 100 μM Trispuffer $\times$ HCl pH 7.6, 3 μM MgCl_2 , 1 μM KBH_4 , 6 μM ATP, 0,4 μM CoA; (●) mit 350 μg FARE, (○) mit 175 μg FARE. Totalvolumen 1.0 ml. bei 37° C.

Abbildung 7 zeigt, daß die Bildung des S-Acyls unter diesen Bedingungen bis etwa zur 30. Minute linear verläuft, d.h. eine Reaktion Nullter Ordnung darstellt; im späteren Verlauf stellt sich ein Gleichgewicht ein und die Reaktion kommt zu einem Stillstand. Der Betrag an Thioester entspricht einer 47 %igen Umwandlung des verfügbaren CoA in IES-CoA. Bei Zusatz der halben Menge an Enzym wurde ungefähr der halbe Betrag an Thioester gebildet. Zusatz von 120 Hefeleinheiten Pyrophosphatase oder von 35 Hefeleinheiten AMP-ase oder beide Phosphatasen zusammen vermochten die Reaktion nicht wieder in Gang zu setzen, eine Produkthemmung, wie sie von Davie et al. (1956) im Falle des Tryptophan aktivierenden Enzyms durch das anfallende Pyrophosphat gefunden wurde, ist dadurch ausgeschlossen. Keiner der Zusatzfaktoren, wie ATP, CoA, IES, kann unter diesen Bedingungen limitierend wirken, daher ist anzu-

nehmen, daß IES-CoA als Reaktionsprodukt die weitere Synthese hindert. Beinert et al. (1953) fanden ähnliche Verhältnisse bei der Verfolgung der Kinetik der Acetyl-CoA-Synthese durch ein Enzym aus Herzmuskel. In ihrem Falle wurden 48 % des CoA in Acetyl-CoA umgewandelt.

Einer Probe des obigen Ansatzes wurden 5 μ M Pyrophosphat (pH 7.6) zugesetzt, wobei eine 65 %ige Hemmung der IES-CoA Ausbeute nach 30 Minuten beobachtet werden konnte. Dies steht in Übereinstimmung mit den Versuchen von Jones et al. (1953) und wird später diskutiert werden.

h) Bestimmung der Michaelis-Konstante für FAAE mit IES als Substrat.

Der praktische Wert der Michaelis-Konstante (K_m) liegt in der Schätzung der nötigen Substratkonzentration um maximale Geschwindigkeit der Reaktion zu erreichen. Als Faustregel gilt dabei, daß 10 oder 90 % der maximalen Geschwindigkeit erreicht sind, wenn die Substratkonzentration $K_m \times 10^{-1}$ oder $K_m \times 10$ ist. Für Enzyme mit geringer Substratspezifität, die eine Reihe von Substraten angreifen können, ist oft dasjenige Substrat mit dem kleinsten K_m -Wert als das "natürliche" Substrat bezeichnet worden (z.B. Meister 1950). In unserem Falle haben wir im FAAE ein Enzym mit ausgesprochener Substratspezifität vor uns. Sowohl ein breites Spektrum an aliphatischen (Mahler et al. 1953) als auch an aromatischen (Schachter und Taggart 1954)

Carboxylsäuren können aktiviert werden. Es war daher von Interesse, die K_m mit IES als Substrat mit anderen Säuren zu vergleichen. Die Bestimmung der K_m erfolgte nach der Methode von Lineweaver und Burk (1934), der doppelt Reziproken-Darstellung, wobei sich K_m als Schnittpunkt der geraden $y = mx + b$ mit der negativen x-Achse ergibt. $y = \frac{1}{V}$; $m = \frac{K_m}{V}$; $x = \frac{1}{S}$; $b = \frac{1}{V_{\max}}$, wobei V die Geschwindigkeit der Reaktion, S die Substratkonzentration darstellt. Für den Fall $y = 0$ ergibt sich $\frac{1}{K_m} = -\frac{1}{S}$.

Die Konzentration an Substrat wurde über einen 20-fachen Bereich variiert. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten, da sich im vorherigen Versuch (Abb. 7) gezeigt hatte, daß die Geschwindigkeit der Reaktion bis dahin konstant bleibt, die Inkubations-

temperatur war 37° C, der pH 7.6. Die gebildete Menge an IES-CoA wurde in der üblichen Weise bestimmt (Abb. 8).

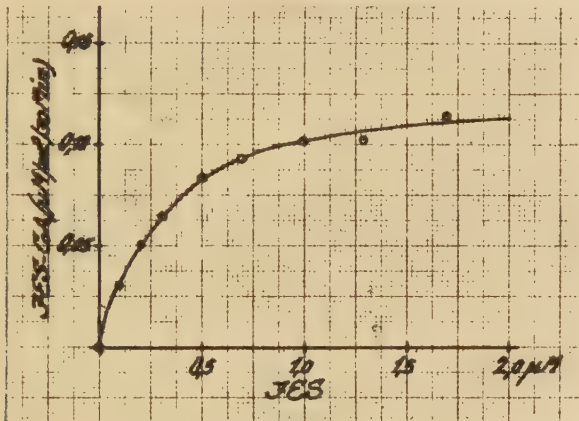


Abb. 8. Zusammenhang zwischen der IES-Konzentration und der Geschwindigkeit der IES-CoA-Bildung durch FAAE. System wie in Abb.7, mit 350 µg FAAE, jedoch mit steigenden Konzentrationen an IES.

S_{IES}	$\frac{1}{S}$	V_{IES}	$\frac{1}{V}$
0.1	10	0.03	33
0.2	5	0.05	20
0.3	3.33	0.065	15.4
0.4	2.5	0.075	13.3
0.5	2	0.086	11.6
0.7	1.43	0.092	10.9
1.0	1	0.102	9.8
1.3	0.77	0.104	9.6
1.7	0.59	0.115	8.7

$S = \mu\text{M/ml}$

$V = \text{Relative Reaktionsgeschwindigkeit, } \mu\text{M IES-CoA pro ml pro 30 Minuten.}$

Tab. 4. Substratkonzentrationen und die dazugehörige S-Acylbildung nebst den inversen Werten errechnet aus Abb. 8 .

Abb. 9 gibt die aus Tabelle 4 gewonnenen Werte in der doppelt reziproken Darstellung.

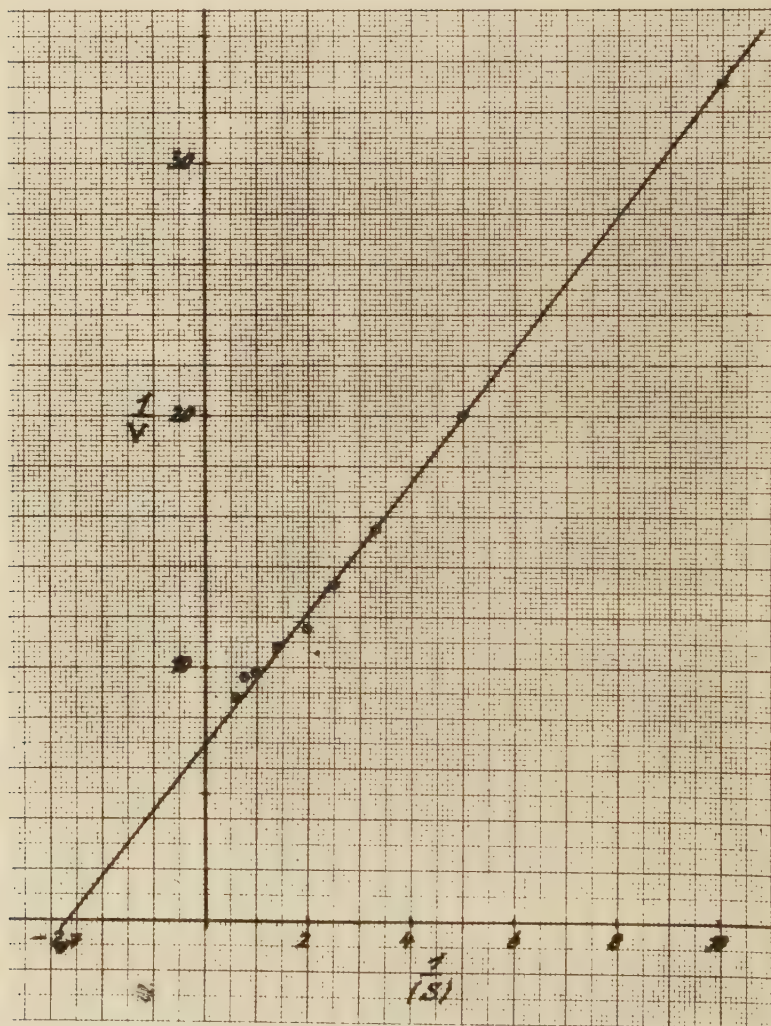


Abb. 9. Lineweaver-Burk-Darstellung für IES als Substrat. Die Geschwindigkeit $1/v$ ist ausgedrückt als μM^{-1} pro ml pro 30 Minuten. Die Substratkonzentration $1/S$ als μM^{-1} pro ml.

Die $-\frac{1}{S}$ Achse wird in unserem Falle bei dem Wert $-2.7 = -\frac{1}{K_m}$ geschnitten. Daraus ergibt sich K_m als 3.7×10^{-4} mol/l.

Im Vergleich mit anderen gefundenen K_m -Werten für andere Substrate ergibt sich :

Caproat	$K_m = 6 \times 10^{-5}$ m (Kellerman 1958)
Octanoat	$K_m = 1.53 \times 10^{-4}$ m (Mahler et al.1953)
p-Aminobenzoat	$K_m = 2 \times 10^{-4}$ m (Kellermann 1958)
Indolacetat	$K_m = 3.7 \times 10^{-4}$ m
Sorbat	$K_m = 4 \times 10^{-4}$ m
Buryrat	$K_m = 1.59 \times 10^{-3}$ m (Mahler et al.1953)

Im Vergleich zu Buttersäure kann also geschlossen werden, daß auch IES für FAAE ein natürliches Substrat darstellt. Obwohl K_m nicht direkt ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat angesehen werden kann (Neilands und Stumpf 1956), ist es doch wahrscheinlich, daß die Affinität von FAAE zu IES größer als zu Buttersäure ist. Außerdem ergibt sich noch, daß wir uns beim Einsetzen von 5 μ M IES/ml im Standardgemisch durchaus im Bereich der maximalen Geschwindigkeit der Reaktion befinden.

i) Die Rolle von Indolacetyladenylat in der Aktivierung von IES.

Die Bilanz der Aktivierung von Carboxylsäure wurde anhand des Beispiels der Acetatthiokinase in Lipmanns Laboratorium (Jones et al. 1953a und b) aufgestellt und folgendermaßen formuliert:

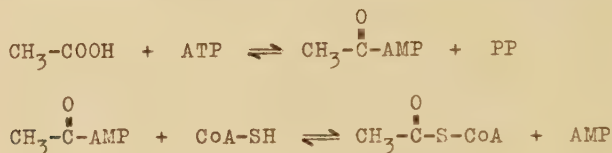


Dabei wurde der feinere Mechanismus durch Isotopen-Experimente mit Hilfe von P^{32} als Reaktion des ATP mit dem Enzym zu einem Enzymadenosinmonophosphatkomplex postuliert, wobei in der Folge das AMP des Enzyms von CoA abgelöst einen Enzym-CoA-Komplex ergäbe, der seinerseits mit Acetat zu Acetyl-CoA und Enzym umgesetzt würde.

Bei einer jüngst durchgeführten Wiederaufnahme des Studiums dieser Reaktion durch Berg (1955, 1956) wurde obiger Mechanismus als unhaltbar erklärt. Folgende Beobachtungen führten Berg zur Aufstellung eines neuen Reaktionsmechanismus unter Einfüh-

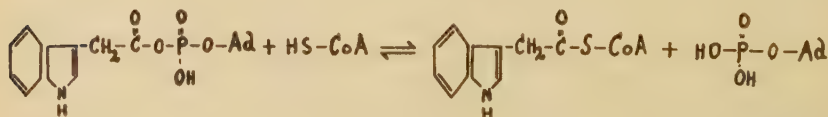
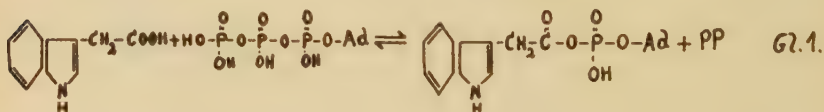
rung einer neuen energiereichen Verbindungsklasse, den Acyladenylenen. Der Austausch von $P^{32}P^{32}$ mit ATP erfordert Acetat; Acethydroxamsäure wird in Abwesenheit von CoA gebildet und synthetisches Acetyladenylenat wird bei der Anwesenheit von Pyrophosphat in ATP übergeführt, in der Anwesenheit von CoA zu Acetyl-CoA.

Daraus ergibt sich folgender zweischrittiger Reaktionsmechanismus:



In der Folgezeit wurde für eine große Anzahl wichtiger ATP-abhängiger Reaktionen die intermidäre Stellung von Acyladenylenen bewiesen: Hoagland et al. (1956), DeMoss et al. (1956), Davie et al. (1956) erstmalig für Aminosäuren, Talbert und Huennekens (1956), sowie Peng (1956) für die Aktivierung von Buttersäure (Jencks und Lipmann (1957) für Hexansäure, Moyed und Lipmann (1957) für Propionsäure, Gignais und Zabin (1958) für Palmitinsäure, sowie für einige aromatische Säuren Moldave und Meister (1957) für Phenylelessigsäure, Kellerman (1958) für Benzoesäure.

Es war nun von Interesse zu untersuchen, ob auch der Heterocyclus IES via IES-AMP aktiviert wird. Es war dies nach den Versuchen von Talbert und Huennekens (1956) Peng (1956) und Jencks und Lipmann (1956) am FAAE wohl anzunehmen. Es galt folgende Formulierung zu beweisen :



Ad = Adenosin

k) Reaktion von IES-AMP mit CoA.

Um Gleichung 2 zu beweisen, wurde ein Gemisch aus 60 μM Tris-puffer pH 8.0, 2 μM KBH_4 , 5 μM MgCl_2 , 0.3 μM CoA, 350 μg PAAE mit 1.3 μM IES-AMP in einem Gesamtvolumen von 0.4 ml bei 37° C für 20 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde IES-CoA auf dreierlei Weise analysiert. Der Rückgang an freien SH-Gruppen, der ja als Maß der Veresterung des CoA dient (1.), wurde gemessen, sowie direkt das IES-CoA mit Salkowskireagenz (2.); die letzte Probe wurde nach 20 Minuten mit 50 μM Glycin pH 8.0 und 1 mg Protein der Am_{46} Fraktion versetzt und die entstandene Indolaceturssäure nach weiteren 40 Minuten auf die bekannte Weise quantitiert (3.). Dabei ergaben sich folgende Werte:

1.	2.	3.
Δ -SH	IES-CoA	Indolacetyl-Glycin
μM	μM	μM
0.176	0.165	0.155

Der Rückgang an freien SH-Gruppen entspricht etwa dem gebildeten, direkt gemessenen Betrag an IES-CoA; auch der Betrag an Acetur-Säure entspricht ungefähr dem intermediär gebildeten IES-CoA.

Die 3 Werte stimmen etwa größenordnungsmäßig überein, was einer Umwandlung des IES-AMP in den IES-Thioester von ca. 13 % entspricht. Kontrollen, die mit Enzym aber ohne CoA inkubiert wurden, liessen keinerlei IES-CoA-Bildung erkennen, jedoch war das IES-AMP nach 20 Minuten völlig hydrolysiert. Eine Kontrolle mit CoA aber ohne Enzym zeigte keinen Rückgang im freien SH-Gehalt. Wenn Magnesium-Ionen im Testansatz ausgelassen wurden, ergab sich eine Verminderung der Synthese um ca. 20 %. Mit diesen Versuchen kann Gleichung 2 als bewiesen angesehen werden.

l) Reaktion von IES-AMP mit Pyrophosphat.

Um Gleichung 1 zu studieren, wurde die Rückwärtsreaktion gewählt. Das entstehende ATP sollte mit Glukose und Hexokinase abgefangen werden und der Rückgang an Pyrophosphat mittels der Methode von Flynn et al. (1954) bestimmt werden. Kaliumfluorid

wurde in das System mit eingeschlossen, um Spuren von Pyrophosphatase in dem Hexokinase-Präparat zu hemmen. 50 μM Tris-puffer pH 7.6, 2.5 μM PP, 5 μM MgCl_2 , 25 μM KF, 50 μM Glukose, 0.1 mg Hexokinase, 0.35 mg FAAE, 1.8 μM IES-AMP in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml wurden 20 Minuten bei 37° C inkubiert. Als Kontrollen dienten Proben ohne Enzym, sowie Proben ohne IES-AMP. Als gebundenes Pyrophosphat gegenüber den Kontrollen ergab sich $\Delta = 0.45 \mu\text{M}$ PP, was bei einem Einsatz von 1.8 μM IES-AMP einer Umwandlung von 25 % entspricht. Dies kann verglichen werden mit Werten von Talbert und Huennekens (1956), Peng (1956), die 10-15 % Umwandlung mit Butyryladenylat bekamen, sowie mit 39 % Konversion für Propionyladenylat (Moyed und Lipmann 1957) und 45 % für Benzoyladenylat (Kellerman 1958).

Auch Gleichung 1 scheint hiermit bewiesen. Die Aktivierung der heterocyclischen IES folgt daher dem selben Typus wie er von anderen schon für aliphatische und aromatische Carboxylsäuren gefunden wurde.

m) Enzymatische Hydrolyse von IES-AMP.

Die verwendeten Enzympräparate aus Mitochondrien zeigten eine sehr hohe hydrolytische Aktivität gegen IES-AMP (Abb.10), wobei freies IES und AMP als Spaltprodukte auftraten. Dies steht in Übereinstimmung mit anderen Autoren; so ist die enzymatische Spaltung z.B. beschrieben für Buturyl-AMP (Talbert und Huennekens (1956) Hexanoyl-AMP (Jencks und Lipmann 1956), Palmityl-AMP (Gignais und Zabin 1958), Benzoyl-AMP (Kellerman 1958). Es scheint sich dabei in jedem Falle der FAAE-Präparate immer um das gleiche hydrolytische Enzym mit hoher Substratspezifität zu handeln.

Die Hydrolyse ist nicht Magnesium-abhängig, da sie nach 24-stündiger Dialyse des Proteins gegen Äthylendiamintetraessigsäure (10^{-3}M) immer noch unvermindert weiterläuft. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Hydrolase um einen Schutzmechanismus der Zelle, indem Acyladenylate, sobald sie von der Enzymoberfläche abdissoziieren sollten, sofort durch Hydrolyse unschäd-

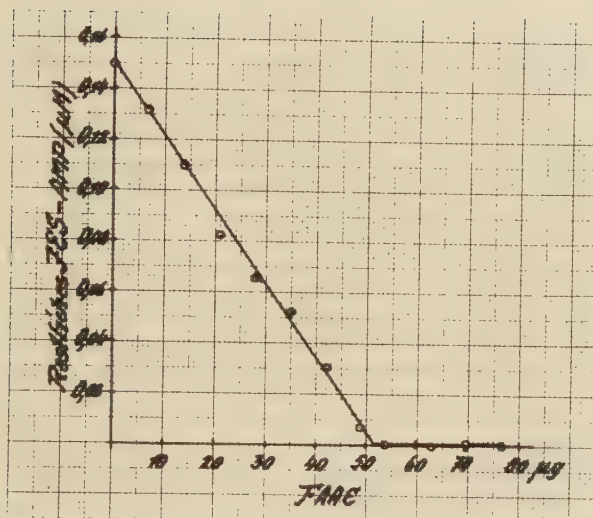


Abb. 10. Hydrolyse von IES-AMP mit steigenden Konzentrationen an FAAE. System: 0.15 μM IES-AMP, 100 μM Trispuffer pH 7.6, steigende Mengen an FAAE. Gesamtvolumen 1.0 ml; Temperatur 37° C; Versuchsdauer 15 Minuten.

lich, d.h. ihres hohen Energieinhaltes beraubt werden. Dies ist nötig, da ja diese Anhydride mit Proteinen und Aminosäuren zu reagieren vermögen und so durch Acylierung am falschen Platz das Zellgeschehen stören könnten. Ob diese hydrolytische Aktivität eine "inherente" Eigenschaft der aktivierenden Enzyme ist, läßt sich noch nicht entscheiden, jedenfalls ist es bis heute noch bei keiner der Thiokinassen gelungen, hydrolytische Aktivität von aktivierender zu trennen.

n) Reaktionen von Indolthioessigsäure.

Es ist ein lang bekanntes Phänomen in der Auxinforschung, daß das Hydroxyl Sauerstoffatom der Carboxylgruppe von Auxinen mit herbicider Wirkung durch Schwefel ersetzt werden kann (Thompson et al. 1947, Wilske und Burström 1950, Jönson et al. 1952). Indolthioessigsäure wurde erstmals von Wieland und Hörlein (1955) synthetisiert und von Jerchel und Müller-Staab

(1954) als im Erbsen-Went-Test aktiv gefunden. Von Burström et al. (1956) wurde das Problem der Thiosäuren nochmals aufgegriffen und anhand der Phenoxyreihe untersucht. Dabei wurde gefunden, daß die Thio-2,4-D und auch die Thio-2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäuren stärker toxisch wirken als die entsprechenden Carboxylverbindungen, was zur Anmeldung eines Schwedischen Patentes Anlaß gab. Es sollte hier nun untersucht werden, ob auch Thiosäuren einer enzymatischen Aktivierung unterliegen.

Sollte sich der Sauerstoff in der Carboxylgruppe der Säure durch Schwefel ersetzen lassen, wäre eine einfache Methode gefunden, an diesem Modellsystem mittels S^{35} Sauerstoffüberführungen während der enzymatischen Aktivierung zu studieren und so die umständliche O^{18} -Methode zu umgehen, falls das hypothetisch zu erwartende Adenosinmonothiophosphat nicht ebenso enzymatisch hydrolysiert wird wie es für Monothio-phosphat durch Binkly (1949) berichtet wurde.

Zunächst wurden 2.5 μM Indolthioessigsäure (IE-SH) mit der Am_{46} Fraktion unter Standardbedingungen für 4 Stunden bei 37° C inkubiert, um eine möglichst vollständige Überführung in ein erwartetes Stoffwechselprodukt zu bekommen. Ätherextraktion und Chromatographie des Ätherrückstandes ergaben eine quantitative Überführung von IE-SH in Indolacetsäure.

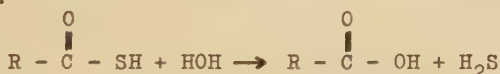
Zunächst war an eine Thioltransacetylaserreaktion zu denken (Brady und Stadtman 1954), wobei die enzymatische Acetylierung des CoA durch die Indolthioessigsäure, ähnlich wie bei den Versuchen von Nachmansohn et al. (1952) bei der Cholinacetylierung mit Thioessigsäure anzunehmen gewesen wäre. Es zeigte sich jedoch, daß das System ATP abhängig war. Die K_m für IE-SH ergab sich ebenfalls wie für IES als 3.7×10^{-4} mol/l. Dieser Umstand ließ vermuten, daß die IE-SH einer Desulfurierung zu IES anheimfällt und diese dann normal aktiviert wird.

Um diese Desulfurierung zu demonstrieren mußte die chromatographische Trennung von IES und IE-SH versucht werden. 70 %iger wässriger Äthylalkohol trennte IES (R_f 0.73) von IE-SH (R_f 0.8) auf Whatman Nr.3-Papier befriedigend. Zu Hilfe kam der

Umstand, daß man mit Ehrlichreagenz die beiden Säuren ausgezeichnet unterscheiden konnte; während IES nach dem Sprühen die übliche blaurote Färbung nach ca. 15-30 Minuten ergab, trat im Falle der IE-SH eine sofortige reingelbe Färbung auf.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß IE-SH enzymatisch wirklich in IES überführt wird.

90 μM Trispuffer, pH 8.0, 2.5 μM IE-SH wurden mit 1 mg Am_{46} in 0.5 ml H_2O für 60 Minuten bei 37° C inkubiert, die Reaktion durch Zusatz von Alkohol (70 % Endkonzentration) unterbrochen und ein aliquot chromatographiert. Die Desulfurierung war nach 60 Minuten vollständig und war Mg^{++} , ATP, CoA und KBH_4 unabhängig. Die Reaktion kann daher folgendermaßen formuliert werden:



Das H_2S konnte beim Inkubieren des obigen 4-fachen Ansatzes in einem Warburg-Gefäß, dessen Mitteleinsatz mit 0.2 ml 1 m Cadmiumacetat beschickt war, als gelber unlöslicher Niederschlag von CdS nachgewiesen werden, ebenso auch mit Bleiacetatpapier.

Ob es sich bei dieser Thiosäure-Desulphydrase um ein neues Enzym oder um die Cysteindesulphydrase von Smythe (1955) oder um das Enzym von Meister et al. (1954), das die Desulfurierung von β -Merkaptopyruvat ausführt, handelt, konnte nicht festgestellt werden. Da diese beiden letztgenannten Enzyme jedoch relativ substratspezifisch sind, ist die Identität unseres Enzyms mit jenen unwahrscheinlich.

Das nächste Experiment sollte darüber Aufschluß geben, ob auch in Pflanzen eine derartige Desulphydrase vorkommt. Dazu wurden 50 g 1 inch lange, 7 Tage alte, etiolierte Erbseninternodien in 500 ml 5×10^{-4} m IE-SH in $\text{m}/60 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 18 Stunden lang im Rotlicht leicht geschüttelt. Danach wurden die Internodien abfiltriert, gut gewaschen, auf Filtrierpapier abgedrückt und in 100 ml 80%igem kochendem Alkohol abgetötet; der Rückstand wurde nochmals mit 100 ml nachgewaschen. Die vereinigten gelben

Extrakte wurden in vakuo auf 2 ml eingeengt und in dem Lösungsmittel B auf Whatman-Nr.3-Papier aufsteigend chromatographiert. Nach dem Entwickeln und Sprühen der Chromatogramme mit Ehrlichreagenz traten 2 definierte Flecken auf (R_f 0.25 und R_f 0.60), beide mit blauroter Farbe und entsprachen den synthetischen Substanzen (IES R_f : 0.60, IES-Asparaginsäure R_f 0.25), die seitlich mitchromatographiert waren. Kein IE-SH war mehr nachzuweisen, obwohl es sich durch die Alkoholprozedur geführt, als stabil erwies. Außerdem war IE-SH auch noch im Helianthustransporttest (Kamien und Leopold 1957) wirksam (Lam et al. 1958) und zeigte die gleiche Transportgeschwindigkeit wie IES. Es war hiermit sowohl durch das Auftreten der freien IES als auch durch deren Entgiftungsprodukt Indolacetyl-asparaginsäure wahrscheinlich gemacht, daß eine derartige, oben erwähnte Desulphydrase auch in Pflanzen vorkommt.

Es kann aus diesen Experimenten gefolgert werden, daß die Wirksamkeit der Thiosäuren mit herbizider Wirkung auf der Konversion der Thioform zum freien Carboxyl beruht. Daß einige Herbizide der Phenoxythioessigsäurereihe eine größere Giftwirksamkeit zeigen als die Carboxyl-tragenden Muttersäuren, beruht sicherlich auf dem Umstand, daß bei der Konversion ein stöchiometrischer Betrag an H_2S frei wird, das ja schon in geringer Konzentration ein starkes Zellgift darstellt, indem es mit Schwermetallen (Fe, Cu ...) von vielen Schwemetallenzymen katalytisch unwirksame Komplexe bildet (James 1953), und auf diese Weise sich die Giftigkeit der Phenoxyssäure und die des H_2S addiert.

o) Konjugierung von Benzoesäure mit Asparagin mittels einer Eiweißfraktion aus Lebermitochondrien.

Nachdem die Aktivierung der IES geklärt war konzentrierte sich unser Interesse auf die mögliche Konjugierung von IES-CoA mit Asparaginsäure, als Analogiefall zur Konjugierung mit Glycin. Dies Konjugat, IES-Asparaginsäure, war von Andreae und Good (1955) erstmals als Entgiftungsprodukt aufgefunden worden. Diese Art der Konjugation konnte in einer späteren Arbeit auf verschiedene Indolcarbonsäuren, 2,4-D, und auch Benzoesäure ausgedehnt werden (Andreae und Good 1957).

Wir versuchten nun IES mit folgenden Pflanzen Proteinfraktionen zu aktivieren: "Castorbean" Mitochondrien (nach Beevers und Walker 1956), "Castorbean" Mitochondrien Acetonpulver, "Castorbean" Homogenaten, sowie Erbseninternodienhomogenaten und Erbseninternodienmitochondrien. Unter den oben angegebenen Standardbedingungen jedoch ließ sich in keinem Fall IES-CoA nachweisen, weder durch Verfolgung des freien -SH noch mit der direkten Messung. In dieses System wurde Asparaginsäure mit eingeschlossen, in der Hoffnung, ein intermediär gebildeter Thioester könnte enzymatisch unter Peptidbildung mit der Aminosäure reagieren; es zeigte jedoch die chromatographische Analyse keine Konjugationsprodukte. Um nun einen "pool" an Thioester zu schaffen wurde folgendes System inkubiert: 90 μM Trispuffer pH 8, 5 μM Mg^{++} , 2 μM KBH_4 , 0.25 μM CoA, 6 μM ATP, 50 μM DL-Asparaginsäure oder 50 μM L-Asparagin, 2.5 μM IES oder 2 μM Benzoesäure 7 C^{14} (1 μC) 700 μg FAAE, 0.35 mg resp. 1.5 mg, resp. 5 mg, "Castorbean" Mitochondrienprotein oder Erbsenhomogenat in 0.5 ml. Das Gemisch wurde 3 Stunden bei 30° C inkubiert. Die Reaktion durch Zusatz von Äthanol (70 % Endkonzentration) unterbrochen, das Protein abzentrifugiert und das klare Überstehende in vakuo bei Zimmertemperatur zur Trockene eingengt mit 0.5 ml 70 % Äthanol wieder aufgenommen und 0.05-0.1 ml der Lösung chromatographiert (Whatman-Papier Nr.3 aufsteigend im Lösungsmittel B). Es ergaben sich keinerlei Anhaltspunkte für das Auftreten von Aminosäurekonjugaten mit diesen Säuren.

In einem letzten Versuch wurde nochmals der Lebermitochondrienextrakt als Modell für die Pflanzen genommen. Radioaktive Benzoesäure wurde wegen der einfacheren Erkennung des Reaktionsproduktes anstelle von IES gewählt. Zu diesem Zwecke wurden 90 μM Trispuffer pH 8, 5 μM MgCl_2 , 4 μM KBH_4 , 0.25 μM CoA, 6 μM ATP, 50 μM L-Asparagin, 1 mg Am_{46} Fraktion und 2 μM Benzoesäure 7 C^{14} (1 μC) in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Aufarbeitung der Ansätze wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Nach Autoradiographie der Chromatogramme für 3 Tage und anschließendes Entwickeln des Röntgenfilmes ergab zwei klare Flecken mit dem Rf 0.63 (2111 IPM) und 0.85 (7710 IPM). Die schnellaufende Verbindung war identisch mit freier

Benzoessäure (Rf 0.85), während die langsamer laufende Verbindung mit Benzoylasparagin denselben Rf 0.65 gemein hatte. Biosynthetisch gewonnene radioaktive Benzoylasparaginsäure besaß den Rf 0.50. Außerdem war noch ein sehr schwacher Fleck mit Rf 0.67 (291 IPM) zu sehen. Das heißt, 21 % der Gesamtaktivität wurde in Benzoylasparagin umgewandelt und 2,9 % in die Verbindung mit dem Rf 0.67. Dies entspricht einer Umwandlung von 0.42 μ M Benzoessäure in Benzoylasparagin. Die Proben, denen entweder das Protein, Asparagin oder CoA entzogen war, zeigten außer freier Benzoessäure keine neuen Flecken. Lediglich der schwache unbekannte Fleck mit dem Rf 0.67 war in der Probe ohne Asparagin zu erkennen. Substitution des Asparagin durch DL-Asparaginsäure führte zu keinem Konjugat.

Der Rest der Reaktionsprodukte wurde in Längsstrichen auf Whatman-Nr.3-Papier aufgetragen und in dem Lösungsmittel B aufsteigend chromatographiert, dabei konnte eine gute Trennung der Banden erreicht werden. Die Bande, die das Benzoylasparagin enthielt, wurde ausgeschnitten und mit heißem Methanol eluiert. Ein aliquot der methanolischen Lösung wurde zur Trockene gebracht und in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen mit 1.0 ml 2 n HCl für 6 Stunden im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Der Inhalt des Glasröhrchens wurde in ein Schälchen überführt und über festem NaOH in vakuo getrocknet, mit wenig H₂O wieder aufgenommen und im Lösungsmittel B auf Schleicher und Schüll-Papier 2043b chromatographiert. Das Chromatogramm wurde autoradiographiert und hinterher mit Ninhidrinreagenz (Cramer 1958) gesprüht. Dabei ergab sich ein radioaktiver Fleck mit dem Rf 0.89 (Benzoessäure Rf 0.90) und ein Ninhidrin positiver Fleck mit dem Rf 0.07, der mit Asparaginsäure (Rf 0.07) übereinstimmte, da ja Asparagin (Rf 0.14) unter diesen Bedingungen der Hydrolyse deaminiert wird.

2) Stoffwechselprodukte von (Carboxyl) C¹⁴ NES
und (Carboxyl) C¹⁴ Benzoesäure in Erbseninter-
nodien.

Die Inkubation von Erbseninternodien mit IES, 2,4-D und Benzoesäure in den Versuchen von Andreae und Good (1955, 1957) erweiterte unsere Kenntnisse über den Stoffwechsel dieser Verbindungen in Pflanzen beträchtlich.

Diese Untersuchungen sollten auch auf das wichtige Auxin NES ausgedehnt werden. Zur Verwendung kamen Erbsenstengel. Die Erbsen (*Pisum sativum* var. Alaska) wurden 7 Tage in feuchtem Vermiculit bei 25° und 80-90 %iger Luftfeuchtigkeit unter Rotlicht gekeimt und dann aus dem ersten Internodium 1 inch lange Stücke herausgeschnitten. 10 g dieser Internodienstückchen wurden in 100 ml m/60 KH₂PO₄-Lösung die 2 mg (ca. 2 µc) NES enthielt, eingelegt und in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Hilfe einer "Wrist action" Schüttelmaschine leicht geschüttelt. Nach 10

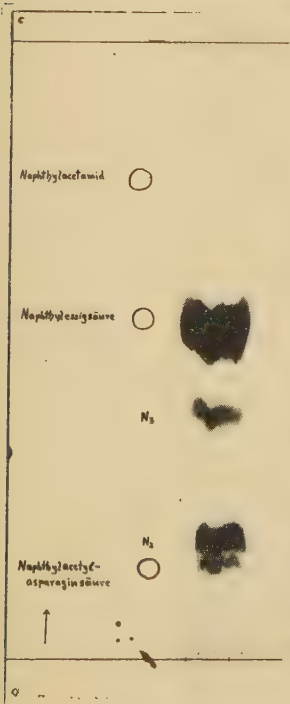
Stunden wurde die Inkubation unterbrochen und die Stengel mittels Alkoholabtötung wie im Versuch mit IE-SH aufgearbeitet. Der Extrakt wurde auf Whatman-Papier Nr. 1 im Lösungsmittel A chromatographiert und ergab nach 4-tägiger Autoradiographie folgendes Bild (Abb.11):

Rf-Werte der Substanzen

	biologisch	synthetisch
N ₁	Rf 0.16	NES-Asparaginsäure Rf 0.16
N ₂	Rf 0.18	
N ₃	Rf 0.38	
N ₄	Rf 0.53	NES Rf 0.54
		NES-Amid Rf 0.75

Abb.11.

Radioaktive Stoffwechselprodukte von (Carboxyl) C¹⁴ Naphthylelessigsäure aus Erbsenepicotylen. Radioautogramm eines 80%igen Alkoholextraktes, der auf Whatman Nr. 1-Papier aufsteigend im Lösungsmittel A chromatographiert wurde. Seitlich liefen nichtradioaktive Markierungssubstanzen mit, diese wurden im UV-Licht als fluoreszierende Flecken erkennbar.



N₁ entspricht NES-Asparaginsäure, ebenso wie N₄, das die Hauptaktivität trug mit unveränderter NES übereinstimmte. N₂ und N₃ sind unbekannte Substanzen, die noch nicht aufgeklärt sind; interessant erscheint uns die Abwesenheit des NES-Amides, das aus Analogie Gründen zu den Arbeiten von Good et al. (1956) und Andreae und Good (1957) zu erwarten gewesen wäre, obwohl unter diesen Bedingungen NES-Amid stabil war.

Wurde nach der Methode von Good et al. (1956) gearbeitet, indem die gefrorenen Gewebestücke mit Natriumbicarbonat extrahiert, der Extrakt mit Amonsulfat gesättigt und anschließend nach Ansäuern auf pH 3 mit Äther extrahiert wurde, ergaben sich wiederum die 2 unbekannten Produkte N₂ und N₃, während auch in diesem Fall das Amid abwesend war. Leider steht uns noch nicht genügend Substanz von N₁, N₂ und N₃ zur Verfügung, um an eine systematische Analyse der Produkte zu gehen.

Die Abwesenheit von NES-Amid veranlaßte uns den Stoffwechsel der Benzoesäure in Pflanzen nochmals zu untersuchen. Inkubation und Aufarbeitung erfolgte auf die schon beschriebene Weise, jedoch mit Benzoesäure 7 C¹⁴ (ca. 10 µc) für 24 Stunden. Die Chromatographie wurde aufsteigend im Lösungsmittel B auf Whatman Nr. 3-Papier ausgeführt. Der Alkoholextrakt wurde als Bande aufgetragen und entwickelt. Das Radioautogramm zeigte nach 4 Tagen Kontaktzeit mit dem Röntgenfilm folgendes Bild (Abb.12).

Rf	IPM	% der Totalaktivität	Markierungssubstanz	Rf
B ₁ 0.37	6379	24 %	Benzoylasparaginsäure	0.36
B ₂ 0.59	3927	14 %		
B ₃ 0.67	688	2.6 %		
B ₄ 0.78	15805	59 %	Benzoesäure	0.75
			Benzamid	0.95

Tab. 5. Rf Werte der Substanzen, die nach dem Verfüttern von 7 C¹⁴ Benzoesäure an Erbseninternodien chromatographisch aufgefunden werden konnten, sowie einiger synthetischer Benzoesäurederivate. Die Radioaktivität der Banden wurde an einem 3 cm breiten Längsstreifen des Chromatogrammes bestimmt.

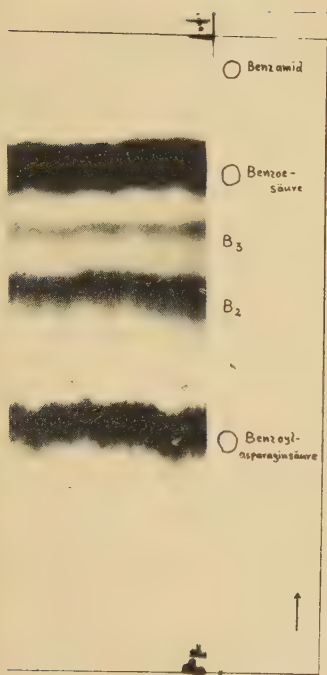


Abb. 12.

Radioaktive Stoffwechselprodukte 7 C^{14} markierter Benzoesäure aus Erbsenepicotylen. Radioautogramm eines 80 %igen Alkoholextraktes der auf Whatman-Nr.3-Papier im Lösungsmittel B aufsteigend chromatographiert wurde. Auf einem Parallelstreifen wurde Benzoesäure, Benzoylasparaginsäure und Benzamid unter den selben Bedingungen chromatographiert und die Flecken im kurzwelligen UV-Licht identifiziert.

Wieder stimmten 2 der 4 Verbindungen in der Lage der R_f -Werte mit den synthetischen Substanzen überein. B_1 mit Benzoylasparaginsäure, B_4 mit freier Benzoesäure. B_1 wurde hydrolysiert, wie es für Benzoylasparagin beschrieben wurde und lieferte freie Benzoesäure und Asparaginsäure.

B_2 und B_3 sind noch nicht analytisch untersucht worden. Abermals findet sich kein Benzamid, wie es von Andreae und Good (1957) berichtet wurde. Benzamid ist unter unseren Bedingungen stabil. Man kann sich der Tatsache nicht verschließen, daß Andreae und Good (1956, 1957) mit dem Auffinden von Amiden ein Irrtum unterlief, zumal kürzlich ein ähnlicher Fall in der Tierphysiologie auftrat, indem ebenfalls Indolacetamid gefunden wurde (Armstrong et al. 1958), was aber Jepson (1958) auf

einen chromatographischen Artefakt zurückführen konnte, da Indolacetylglucosiduronsäure, das vom tierischen Organismus gebildet wird, und Indolpyruvat durch Kontakt mit NH_3 im alkalischen Milieu in das Amid übergeführt werden. Es könnte sich daher bei unseren Verbindungen B_2 oder B_3 um Benzoylglucuronsäure oder ein ähnliches Derivat handeln, das unter den alkalischen Bedingungen (Good et al. 1956, Andreae und Good 1957), wie sie im NaHCO_3 -Extrakt vorliegen, durch Zugabe von Ammoniumsulfat in Benzamid überführt wird.

3) Biologische Aktivität der 2,4-D-Hydroxamsäure.

Da die Hydroxamsäurebindung ($R-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NHOH$ chemisch eine recht stabile Verbindung darstellt, war es von Interesse Auxin-Hydroxamsäuren im Avenatest zu untersuchen, nachdem die Notwendigkeit der freien Carboxylgruppe zur Auxinaktivität bis heute noch einer lebhaften Diskussion ausgesetzt ist (Veldstra 1956).

Außerdem war es von Interesse diese Hydroxamsäure zu testen, da man unter Umständen erwarten konnte, daß die Substanz vielleicht eine größere Toxizität aufweisen würde als die Stammsäure, da ja im Falle einer Abspaltung des Hydroxylamin dessen Giftwirkung sich zu der der Säure addieren könnte und so die Substanz stärker toxisch wirkt als die ursprüngliche Säure.

Der Avenazy lindertest (*Avena sativa* var. victory) wurde in Petrischalen mit 10 ml m/60 KH_2PO_4 -Lösung, der verschiedene Mengen von 2,4-D oder 2,4-D-Hydroxamsäure zugefügt war, ausgeführt. Zur Verwendung kamen 2-2,5 cm lange Avenacoleoptilen, aus denen ein 1 cm langer Zylinder mit Primärblatt 2-3 mm unterhalb der Spitze geschnitten wurden. Sowohl die Anzucht in Vermikulit als auch alle Manipulationen erfolgten im Rotlicht bei 80-90 % Luftfeuchtigkeit. Abgelesen wurde nach 22 Stunden durch Auflegung der Koleoptilen auf Millimeterpapier und Ablesen auf die nächste 0.5 mm-Marke nach Busse und Kandler (1956).

Abb. 13 zeigt graphisch das Resultat des Avenatestes als Mittelwerte aus 3 Versuchen mit je 20 Koleoptilen. Eine Parallelität der Zuwachskurve zwischen 2,4-D und 2,4-D-Hydroxamsäure konnte gezeigt werden. Der Einsatz der Hemmung war in beiden Fällen bei 3×10^{-5} M Säurekonzentration festzustellen. Eine gesteigerte Toxizität der Verbindungen ergab sich nicht. Ähnliche Kurven wurden für IES-Hydroxamsäure und NES-Hydroxamsäure erhalten. Jedoch war der maximale Zuwachs des uns zur Verfügung stehenden Hafermaterials so gering, daß dieser Test mehr qualitativ als quantitativ bewertet werden muß.

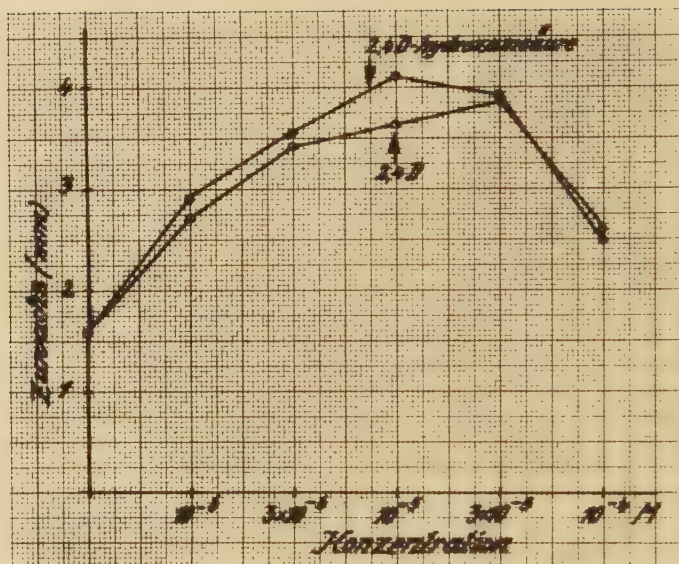
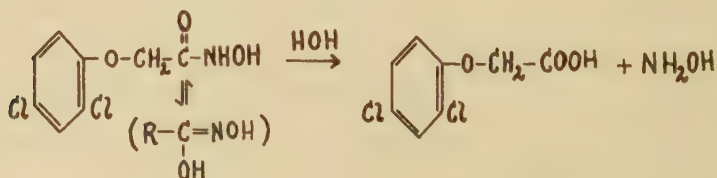


Abb. 13. Streckungswachstum von 1 cm langen Avenacoleoptylzylindern mit 2,4-D bzw. 2,4-D-Hydroxamsäure. Endablesung nach 22 Stunden.

Da sich 2,4-D-Hydroxamsäure als wachstumsfördernd im Avenatest erwiesen hatte, sollte nun entschieden werden, ob die Hydroxamsäure oder die freie 2,4-D die Aktivität ausmacht. Da keine radioaktive 2,4-D-Hydroxamsäure zur Verfügung stand, wurde der enzymatische Test gewählt, wobei eine Aufspaltung der 2,4-D-Hydroxamsäure in 2,4-D und Hydroxylamin anhand der Abnahme der FeCl_3 -Reaktion der Hydroxamsäure (Lipmann und Tuttle 1945) oder des auftretenden freien Hydroxylamin getestet werden sollte.



Nachdem sich die Quantitierung des Hydroxylamins mittels 8-Oxyquinolinol, nach der Methode von Frear und Burell (1955) als weitaus sensitiver und spezifischer als die FeCl_3 -Methode erwies, wurde diese Methode verwendet.

Als Enzym wurde eine Proteinfraction aus etiolierten Erbseninternodien verwendet. Erbsenstängel wurden bei 0°C vorgekühlt und dann mit wenig Sand und wenig 0.02 m Phosphatpuffer pH 7.5 im Mörser mazeriert. Das resultierende Homogenat wurde durch Gaze abgedrückt und die groben Bruchstücke in der Servall-Zentrifuge bei $10\,000 \times g$ für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Überstehende wurde auf das Hydroxamsäure-spaltende Enzym folgendermaßen getestet. $1.0 \mu\text{M}$ 2,4-D-Hydroxamat (K^+) wurde in 0.02 m Phosphatpuffer pH 7.0 mit dem Enzym versetzt (Gesamt-volumen 1 ml) und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Durch Zufügung von 1 ml 10% Trichloressigsäure wurde die Reaktion unterbrochen. Das Protein wurde abzentrifugiert und das Überstehende in ein neues Reagenzglas überführt. Der Proteinniederschlag mit 1 ml H_2O nachgewaschen und zu der vereinigten klaren Lösung (3 ml) 1 ml einer 1% alkoholischen 8-Quinolinol-Lösung gegeben, das Glas geschüttelt, 1 ml 1 m Natriumkarbonat-Lösung zugegeben und daraufhin heftig geschüttelt (Oxydation), das Reagenzglas verschlossen und 1 Minute in ein siedendes Wasserbad eingehängt, wobei sich eine stabile grüne Farbe entwickelte. Danach wurde 15 Minuten gekühlt und bei $705 \text{ m}\mu$ im Beckman DU-Spektrophotometer gemessen. Eine Standardkurve wurde mit $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ aufgestellt. Es ergab sich, daß die Proteinlösung aus den Erbseninternodien 2,4-D-Hydroxamsäure-spaltende Aktivität aufwies. Die Proteinlösung wurde nun mit Ammoniumsulfat fraktioniert (French und Milner 1955), wobei in der Fraktion zwischen 30 - 50% Ammoniumsulfatsättigung eine 2.5 -fache Anreicherung des Enzyms erzielt wurde. Es wurde 6 Stunden bei 0° gegen 0.02 m Phosphatpuffer pH 7.5 dialysiert. Die Substratkonzentration konnte wegen der Schwerlöslichkeit des Kaliumsalzes der 2,4-D-Hydroxamsäure nicht erhöht werden. Es ist anzunehmen, daß das Enzym unter diesen Bedingungen nicht gesättigt war.

Das pH-Optimum ist relativ schmal und scheint bei pH 7.5-8.0 zu liegen (Abb. 14).

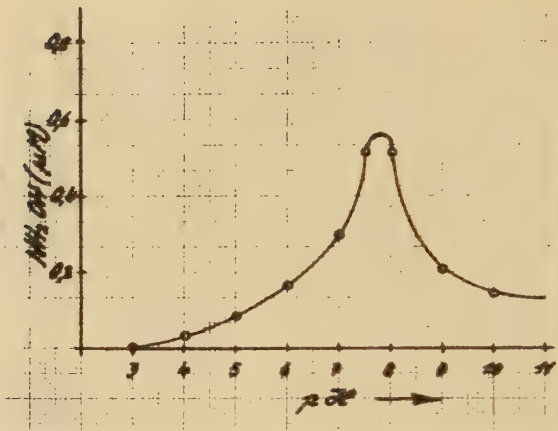


Abb. 14. pH-Abhängigkeit der enzymatischen Spaltung von 2,4-D-Hydroxamsäure. System: 1 μM 2,4-D-Hydroxamat, 4 mg Erbsenprotein Am_{30-40} , 20 μM Pufferlösung (siehe Material und Methoden); Gesamtvolumen 1 ml, inkubiert bei 37° C für 90 Minuten.

Als letztes wurde noch die Abhängigkeit der Spaltung der 2,4-D-Hydroxamsäure von der Proteinkonzentration untersucht (Abb.15).

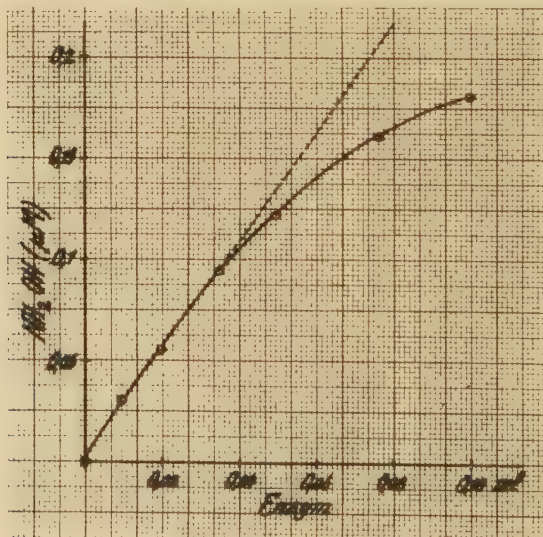


Abb. 15. Abhängigkeit der Spaltung von 2,4-D-Hydroxamat von der Proteinkonzentration. System: 1 μM 2,4-D-Hydroxamat, 20 μM Phosphatpuffer pH 7.5, steigende Mengen an Protein (0.1 ml = 4 mg Protein) in einem Gesamtvolumen von 1 ml, Versuchsdauer 30 Min. bei 37° C.

Die Spaltung der Hydroxamsäure scheint bis zu einer Konzentration von 2 mg Protein/ml proportional der Menge an Enzym zu sein, während sich bei höherer Proteinkonzentration der Umsatz verringert, möglicherweise durch eine Hemmung des Enzyms durch das entstandene NH_2OH . Hitzeinaktiviertes (30 Sec. bei 100°C) Enzym zeigte keine Spaltungsfähigkeit mehr. Enzym das 5 Minuten bei 50° gehalten wurde, war ebenfalls inaktiv. Eine Metallförderung der Proteinfraction war nicht wahrnehmbar (Mg^{++} , Mn^{++}). Mit IES-Hydroxamat, NES-Hydroxamat oder Benzoylhydroxamat als Substrat war keine NH_2OH -Abspaltung festzustellen, lediglich noch Phenoxyacetylhydroxamat wurde von diesem Enzym gespalten. Papain oder Chymotrypsin vermochten 2,4-D-Hydroxamsäure nicht in ihre Bestandteile zu zerlegen.

Obige Beobachtungen über dieses Enzym sollen lediglich als Vorarbeit dienen. Es handelt sich dabei um einen neuen Typus einer Hydrolase, über den unseres Wissens bisher noch keine Angaben vorliegen, ein Hydroxamsäure-spaltendes Enzym. Interessant wäre, ob das Enzym auch die Rückreaktion zu katalysieren vermag, nämlich die Bindung des freien toxischen Hydroxylamins an eine Carboxylgruppe und somit zur Schaffung einer nichttoxischen Verbindung führt, die dann vielleicht zum Säureamid weiter reduziert werden könnte. Liegt das Gleichgewicht der Reaktion jedoch nur auf der Spaltung der Hydroxamsäure, so ist die Rolle des Enzyms fraglich, denn bisher sind Hydroxamsäuren als natürlich vorkommende Verbindungen noch nicht gefunden worden; lediglich nach NO_2^- Gaben an Hefe konnte Virtanen und Sanis (1956) und Virtanen (1957) Acetylhydroxamsäure chromatographisch nachweisen. Vielleicht kommt in diesem Zusammenhang dem spaltenden Enzym eine gewisse Schutzfunktion zu, indem nämlich die mögliche Festlegung gewisser aktivierter Säuren durch zufällige Bindung an Hydroxylamin reversibel gestaltet wird, wie sie im oben zitierten Fall von Virtanen und Sanis (1956) oder beim Glutamin-synthetisierenden Enzym aus Erbsensamen nach Elliott (1953) auftreten kann.

IV. Diskussion der Ergebnisse.

Die Versuche wurden schon in den betreffenden Kapiteln diskutiert, daher soll hier nur noch einmal zusammenfassen auf die Experimente eingegangen und auch versucht werden, Aktivierung des Auxins und Wachstum miteinander in Verbindung zu bringen.

Es konnte gezeigt werden, daß der von Mahler et al. (1953) für FAAE aufgestellte Reaktionstyp der Carboxylaktivierung mittels ATP und CoA auch für die Auxine IES, NES, 2,4-D zutrifft. Daß das Produkt der Aktivierung von IES wirklich IES-CoA ist, wurde durch Isolierung und chromatographische Identifizierung des Thioesters und durch einen spezifischen Test für IES-CoA mittels Salkowskireagenz bewiesen. Der feinere Mechanismus der Aktivierung konnte durch die enzymatische Aktivität des synthetischen Intermediärproduktes IES-AMP ermittelt werden. Die IES entspricht darin dem bekannten Mechanismus der von Berg(1956) aufgefundenen Essigsäureaktivierung.

Die physiologische Bedeutung dieser Aktivierung kann zweifach sein; sie könnte sowohl eine Entgiftung der Säure einleiten, als auch im Zusammenhang mit dem Wachstum stehen. Als erstes soll dabei die Acylierung von Aminosäuren diskutiert werden.

Bisher liegen Berichte über solche Fermente vor, die Reaktionen katalysieren, die aromatische Säuren mit Glycin (Schachter und Taggart 1954), Glutamin (Moldave und Meister 1957), Ornithin (McGilvery und Cohen 1950) und Asparagin (unsere Versuche) konjugieren. Weiterhin ist nach den Versuchen von Andreae und Good (1955, 1956, 1957) auch noch eine Asparaginsäure N-acylase in Pflanzen zu erwarten, die Auxine und andere aromatische Säuren mit Asparaginsäure konjugiert. Schlechthin wird die Konjugierung von körperfremden aromatischen Säuren mit Aminosäuren als Entgiftung bezeichnet. Es wurde aber auch gezeigt, daß auch normale im Stoffwechsel vorkommende Säuren entgiftet werden. So schreiben Schachter und Taggart in ihrer Arbeit "Glycine N-acylase: Purification and properties" (1954,

S.274) : "The physiological role of this enzyme remains obscure. The term "detoxication mechanism" is apparently meaningless when applied to the conjugation of glycine with normal metabolic intermediates such as acetate, butyrate, etc. It appears reasonable to assume that benzoate and certain other foreign compounds enter fortuitously into metabolic reactions that normally yield glycine conjugates of biological importance." Schachter und Taggart lehnen also die althergebrachte Theorie von der Entgiftung der Benzoesäure als Hippursäure ab, es würde sich dabei lediglich um eine zufällige Konjugierung mit Glycin handeln. Im Verlauf jüngster Studien an aktivierten Carboxylgruppen läßt sich jedoch ein neuer Gesichtspunkt, der für eine Notwendigkeit der Entgiftung spricht, anführen. Wieland und Merz (1958) fanden, daß Modellsubstanzen für aktivierte C¹⁴ Aminosäuren wie Alanylthiophenol und SL-Methionyl S³⁵ Thiophenol unter physiologischen Bedingungen ihren Aminosäurerest mit Proteinen (Milchsäuredehydrogenase und Serum Albumin) nichtenzymatisch in feste Bindung bringen. Durch Abbau der so erhaltenen radioaktiven Proteine ließ sich zeigen, daß hauptsächlich die E Aminogruppe des Lysins als Anknüpfungspunkt diente, wobei es gelang, bis zu 30 Moleküle Methionin an ein Albuminmolekel zu binden. Ebenso konnte Castelfranco et al. (1958) eine nichtenzymatische Reaktion von C¹⁴ markierten Aminosäure-Adenylsäure-Anhydriden an Rattenleberproteine zeigen. Aus der Reaktionsfreudigkeit von aromatischen Säure-Adenylsäureanhydriden mit Aminosäuren (Kellermann 1958, Zenk 1958 und diese Versuche) läßt sich schließen, daß diese aktivierten Säuren Proteine ebenfalls zu acylieren vermögen. Durch diese Acylierung büßen sicherlich die entsprechenden Proteine, wenn es sich um Fermente handelt, einen Teil ihrer enzymatischen Wirksamkeit ein. In der Zelle dürfte nun die Situation gegeben sein, daß körperfremde Säuren wohl aktiviert aber ob der Funktionslosigkeit dieser Komplexe nicht physiologisch gerichtet weiter reagieren und dazu neigen, umgebende Proteine zu acylieren und so zu inaktivieren. Um dies zu verhindern greift die Zelle dazu, die Carboxylgruppe in einer Peptidbindung festzulegen und so an einer unspezifischen Weiterreaktion zu hindern. Gewiß

könnten auch die Acyl-AMP-asen, die ja in großer Konzentration in der Zelle vorliegen (Talbert und Kuennekens 1956, Kellermann 1958, diese Versuche), sowie auch Acylthioesterase (Gergely 1955) die unerwünschten aktivierten Säuren deacylieren, jedoch würde dies zu einem sinnlosen Verbrauch an ATP in der Zelle führen, da ja die so freigemachten Säuren wieder aktiviert würden und abermals der enzymatischen Hydrolyse anheimfallen würden. Selbst bei normalen im Stoffwechsel vorkommenden Säuren ist es denkbar, daß im Falle eines Stauens der aktivierten Produkte diese durch Konjugierung mit Aminosäuren am unspezifischen Weiterreagieren gehindert werden.

Eine Sonderstellung nimmt 2,4-D ein. Unsere Untersuchungen zeigten, daß 2,4-D wohl aktiviert, jedoch nicht meßbar mit Glycin konjugiert wird, woraus eine relativ hohe Giftigkeit der Verbindung auf für Tiere postuliert werden kann. Tatsächlich liefert Szent-Györgyi (1957) Angaben, wonach 300 mgm 2,4-D/kg Maus lethal wirken, während 200 mgm/kg (= ca. $10^{-3}M$) schwere myotonische Symptome auslösen. Ebenso zeigten Andreae und Good (1957) beim Inkubieren von intakten Erbsenstengeln mit C^{14} 2,4-D, daß sich die Säure im Gewebe akkumuliert und kaum metabolisiert wird, ganz im Gegensatz zu IES. Die genannten Autoren schließen daraus: "It is tempting to suggest that this difference is one reason for the potent herbicidal activity of 2,4-D for being resistant both to degradation and to conjugation, 2,4-D remains in the plant tissues as the free acid and is able to exert its physiological action long after growthsubstances such as indole acetic acid have been metabolized."

Es ist verlockend, die stark phytotoxische Wirkung von 2,4-D auf dieser Basis zu diskutieren, nämlich daß die Säure jeglicher Degradierung und Entgiftung widersteht, wohl aber aktiviert wird, was nun einerseits zu Reaktionen mit spezifischen oder unspezifischen Rezeptoren in der Zelle führen kann und so toxische Symptome hervorruft.

Nun kann aber diesem Aktivierungsprozeß von Auxinen auch noch eine Bedeutung in der Wachstumsreaktion zukommen. Es war in der

Vergangenheit vielfach von der Proteingebundenheit von IES die Rede gewesen. So konnten Skoog und Thimann (1940), Wildman und Gordon (1942), Berger und Avery (1944), Gordon (1946), Muir (1947), Wildman und Bonner (1947), Moewus (1950) und Larsen (1951) durch Behandlung von Pflanzengewebe und Pflanzenproteinen mit proteolytischen Agentien daraus IES in Freiheit setzen. Ebenso zeigte Inkubation von Geweben mit radioaktiven IES, daß hinterher gewisse Proteinfractionen die Radioaktivität trugen. Durch Elektrophorese, Ultrazentrifugation, Trichloressigsäure und Ammonsulfatfällungen konnte die Proteinbindung des C^{14} demonstriert werden (Gordon, S.A. persönliche Mitteilung). Ebenso berichteten Siegel und Galston (1953) über die experimentelle Kupplung von IES an Erbsenwurzelpoteine in vivo und in vitro. In einem System, das IES, Protein und ATP enthielt, sollte es ihnen gelungen sein, ein an Protein gebundenes IES zu erhalten. Diese Konjugierung mit dem Protein wurde sowohl durch CoA als auch durch Jodacetat gehemmt, was sie dadurch zu erklären suchten, daß CoA den IES-Teil des Proteins ablöste unter Bildung von IES-CoA und freiem Protein. Von diesem IES-Protein schrieben Siegel und Galston (S.1116): "Whether or not the auxin-protein described here is the catalytic entity long postulated to be involved in the growth reaction, the fact that free auxin may be firmly bound to protein must have some implications for growth." Leider ließen sich die Experimente von Siegel und Galston weder durch Andreae (1956) noch durch eigene Versuche bestätigen. Daß es sich bei den von Siegel und Galston gefundenen wasserlöslichen ätherunlöslichen (pH 3) Reaktionsprodukt von CoA mit dem IES-Protein nicht um IES-CoA gehandelt hat, geht daraus hervor, daß IES-CoA mit Salkowskireagenz eine blauviolette Farbe (Maximum bei 560-570 m μ) besitzt, während Galston's Produkt IES Farbe (Maximum bei 520 m μ) besaß. Daß es sich auch nicht um IES-Asparaginsäure gehandelt hat, wie Galston (1956) vorschlägt, geht sowohl aus der Ätherlöslichkeit des Peptides als auch durch dessen charakteristische Färbung und Farbentwicklungsgeschwindigkeit (Andreae und Good 1955) hervor, die Galston nicht beobachtet hatte.

Trotzdem sprechen die Befunde aller obig zitierter Autoren dafür, daß proteingebundenes IES in der Natur vorkommt und es ist mit Moewus (1950), Larsen (1951) und Siegel und Galston (1953) anzunehmen, daß dieses IES-Protein die lang vorhergesagte katalytische Funktion im Wachstumsprozeß zu spielen vermag. Nachdem dieses proteingebundene IES durch proteolytische Agentien in Freiheit gesetzt wird, ist es wahrscheinlich, daß es sich in einer peptidartigen Bindung an dem Protein befindet, was auch Wieland und Hörlein (1955) dazu veranlaßte, IES-Peptide chemisch zu synthetisieren. Die Peptidbiosynthese steht zur Zeit immer noch im Brennpunkt des Interesses. Nachdem die Peptid "linkage" mit 2-3000 cal/mol über der Energie der freien Säure liegt, muß die Vereinigung über eine Aktivierung laufen, d.h. die Carboxylgruppe muß energetisch gehoben werden, um mit der Amino- gruppe reagieren zu können; diese Hebung erfolgt im Fall einfacher Peptide (Fettsäuren und Analoge + Aminosäure) wie auch unsere Versuche beweisen, über Acyladenylate und Acyl-CoA-Verbindungen, welche dann mit der Aminogruppe der Aminosäuren reagieren, während kompliziertere Peptide (Aminosäure + Aminosäure) nach Hoagland et al. (1958) dadurch aufgebaut werden, daß das Aminosäureadenylat mit Ribonucleinsäure (RNS) reagiert und einen RNS-Aminosäurekomplex bildet, der entweder direkt oder nach Übertragung des Acyls auf höhermolekulare RNS zur Synthese des Peptidgliedes verwendet wird. Welchen dieser beiden Typen Auxine folgen, wenn sie an Protein gebunden werden, läßt sich nicht entscheiden; sicher jedoch ist nur, daß das Auxinmolekül eine Aktivierung, sei es zur Stufe des IES-AMP oder IES-CoA durchmachen muß, um die nötige Energie zur Reaktion mit der Aminosäure zu gewinnen.

Für ein intermediäres Auftreten von IES-CoA im IES-Stoffwechsel sprechen bis jetzt schon mehrere Versuche. Als erste demonstrierten Leopold und Guernsey (1953) mittels Tomatenovar-Mitochondrien die direkte ATP abhängige Acylierung von CoA mit Auxinen mit Hilfe des Nitroprussidtestes auf freie Sulfhydrylgruppen. Die Versuche wurden jedoch von Leopold und Price (1956) widerrufen, da es sich um unspezifische Oxydationen der SH-Gruppe von CoA gehandelt haben soll. Die in

dieser Arbeit berichteten Versuche, die Auxinaktivierung mittels der Modellreaktion mit FAAE zu studieren, zeigten eindeutig, daß IES-CoA intermediär auftritt. Daß FAAE auch im pflanzlichen Gewebe vorkommt, geht wohl aus der β -Oxydation von Fettsäuren mit Erdnußhomogenaten hervor (Stumpf und Barber 1956), da ja die Aktivierung der Säuren mit CoA die Einleitung des β -Oxydationszyklus darstellt (Lynen 1953). Andreae und Good (1957 stellten ebenfalls β -Oxydation und zwar von Indolbuttersäure in Pflanzen fest. Beim Inkubieren von Erbsenstengeln mit diesen Säuren konnte sowohl freie IES als auch IES-Asparaginsäure nachgewiesen werden. Dieser Vorgang muß so interpretiert werden, daß zunächst Indolbuttersäure mittels ATP, CoA und FAAE zu Indolbuttyryl CoA aktiviert wird, das das bekannte β -Oxydationsschema durchläuft und dann auf der Stufe des Indolacetoacetyl-CoA der thioclastischen Spaltung mit CoA unterliegt, wobei IES-CoA und Acetyl-CoA auftreten. Das gebildete IES-CoA könnte mit Asparaginsäure weiter zu IES-Asparaginsäure reagieren.

Wains Gruppe in England befaßte sich schon seit langem mit der β -Oxydation von chlorierten Phenoxysäuren mit verschiedenen langen Seitenketten. Dabei zeigte sich, daß solche Säuren mit einer geradzahligen Anzahl von Methylengruppen in der Seitenkette zu Phenol abgebaut wurden und im Wachstumstest nicht aktiv waren, während solche Säuren mit ungeradzahliger Anzahl von Methylengruppen als Endprodukt der β -Oxydation Chlorphenoxyessigsäure lieferten, die im Wachstumstest stark aktiv war (vgl. Fawcett et al. 1956). Auch hier muß angenommen werden, daß das Endglied der β -Oxydation im Falle einer ungeraden Anzahl von Methylengruppen in der Seitenkette Chlorphenoxyacetyl-CoA ist. Kürzlich untersuchte dieselbe Gruppe (Fawcett et al. 1958) die β -Oxydation von Omega-(3-indolyl)alkancarboxylsäuren in Erbsen oder Weizen-Gewebestücken mittels chromatographischer Identifizierung der auftretenden Zwischenprodukte. Dabei zeigte sich, daß Indolessigsäure als Oxydationsprodukt von Indolbutter- und -caprylsäure auftrat, während Indolvaleryl- und -heptanoylsäure Indolpropionsäure lieferten; alle getesteten Säuren (Methylengruppen in der Seitenkette von 1-6) waren in einer

Konzentration von 10^{-4} molar im Weizenzyklindertest stark aktiv. Daraus läßt sich schließen, daß sowohl Indolelessigsäure, als auch Indolpropionsäure per se wachstumsstimulierend sind und die β -Oxydation auf der Stufe der Propionsäure stehen bleiben kann. In jedem Fall muß wieder als Endprodukt der β -Oxydation Indolacetyl- oder Propionyl-CoA angenommen werden. Obige Autoren heben hervor, daß keine Konjugationsprodukte der Säuren mit Asparaginsäure aufgetreten sind, was aber an einem methodischen Fehler der verwendeten Ätherextraktion der wässerigen Gewebeextrakte lag, da die Peptide in der vorliegenden wässerigen Lösung ausgesalzt werden müssen um in die Ätherphase übergeführt zu werden.

Gordon (1956) fand, daß die Konversion von Tryptophan und auch die von Indol-3-acetaldehyd zu IES stark radiosensitiv war, während große Dosen ionisierender Strahlung keinen Effekt auf die enzymatische Transformation von Indolpyruvat zu IES im selben Pflanzenmaterial hatte. Er folgerte daraus, daß die IES Synthese aus Indolpyruvat, durch Oxydation zu Indolacetyl-CoA via-Reduktion von Liponsäure ohne Freisetzung von freiem Aldehyd oder Acetat vor sich geht, ähnlich wie es von Gunsalus et al. (1955) für Pyruvat beschrieben ist. Gordon schreibt (S.74): "The process of auxin information may be channeled directly into the auxin action mechanism with out necessarily going to free indole acetic acid."

Schließlich kann noch die Tatsache, daß nach Verfütterung von IES an Pflanzen IES-Asparaginsäure auftritt, dafür gewertet werden, daß IES-CoA als Intermediärprodukt auftritt, in Analogie zur Hippursäure Biosynthese (Schachter und Taggart 1953); diese Ansicht wird auch von Andreae und van Yesselstein (1956) diskutiert. In der quantitativen Untersuchung der IES-Asparaginsäurebildung durch obige Autoren ergab sich der außerordentlich interessante Zusammenhang, daß die Produktion von IES-Asparaginsäure der Wuchsstoffwirkung bis zu einer Konzentration von 10 ppm IES im Medium parallel lief, während die Konzentration von freier IES im Gewebe vernachlässigbar war. Konzentrationen über 10 ppm zeigten eine Hemmung des Wachstums und ein graduelles Ansteigen der internen IES-Konzentration,

während keine weitere Zunahme an IES-Asparaginsäure erfolgte.

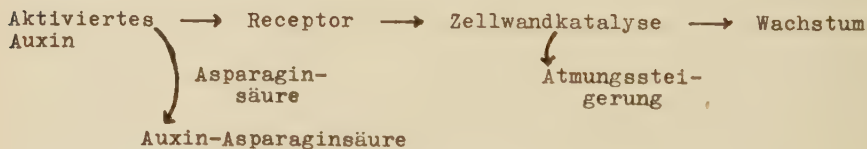
Betrachten wir das Maß der IES-Asparaginsäurebildung als Maß für die Aktivierung von IES, so ergibt sich die Möglichkeit, daß im Bereich bis zu 10 ppm alle ins Gewebe eindringende IES aktiviert wird, wobei ein Teil zur Reaktion mit einem spezifischen Rezeptor in die Zelle gelangen könnte, während der überflüssige Teil des aktivierten Produktes mit Asparaginsäure weiterreagieren könnte. Bei über 10 ppm IES im Medium ist der Konjugierungsmechanismus gesättigt und alles weiter eindringende IES wirkt toxisch, d.h. wachstumshemmend.

Alle diese experimentellen Befunde machen es wahrscheinlich, daß das in allen Fällen intermediär gebildete energiereiche IES-CoA ohne die freie, energiearme Säureform zu erlangen, gleich mit einem spezifischen Rezeptor in der Zelle reagiert, um so einen Komplex zu bilden, der seinerseits die Wachstumsreaktion auslöst.

Die Wuchsstoffwirkung wird seit kurzem mehr und mehr mit dem Zellwandstoffwechsel in Verbindung gebracht. Sicher ist, daß IES die mechanische Eigenschaft der Zellwand zu beeinflussen vermag (vgl. Söding 1952), wobei die plastische Dehnbarkeit nicht nur an wachstumsfähigen Zellen erhöht wird (Burström 1954), sondern auch an wachstumsunfähigen Zellen von Speicherparenchym (Brauner und Hasman 1952). Boroughs und Bonner (1953) fütterten Avenacoleoptile mit C^{14} -Glucose und markiertem Acetat in Gegenwart von IES und fanden, daß die Verbindungen beschleunigt in die nicht celluloseartigen Polysaccharide eingebaut werden, während die Geschwindigkeit des Einbaues bei den Hemicellulosen und Pektinen etwas absank. Busse und Kandler (1956) fanden bei ihren Untersuchungen über die Kinetik der Atmungs- und Wachstumssteigerung von Avenacoleoptilen bei IES-Zusatz, daß die Atmungsförderung erst dann voll in Erscheinung tritt, wenn die Wachstumsgeschwindigkeit in der ersten Stunde schon ihr Maximum erreicht hat. Aus diesen Befunden entwickelten sie die Vorstellung, daß IES primär einen Umbau der Wandsubstanz bewirkt, der zu einer Plastizitätserhöhung führt und damit eine Streckung der Zellen mit Hilfe os-

motischer Kräfte gestattet. Durch nachfolgende Neusynthese von Wandmaterial wird der neue Zustand fixiert, wobei der vermehrte Energiebedarf, der zu dieser Synthese benötigt wird, zu einer Atmungssteigerung führt. Ordin et al. (1955) demonstrierten, daß Auxin den Einbau von Methionin-Methyl C¹⁴ in heißwasserlöslichen nicht Zellulose haltigen Fraktionen der Zellwand beschleunigt. Durch diese Versuche angeregt untersuchte Glasziou (1957a, 1957b und Inglis 1958) den Effekt von Auxinen auf die Pektinmethylesterase von Tabak und Artischockengewebe. Dabei zeigte sich, daß IES, 2,4-D und NES die Bindung des Enzyms an die Zellwand (binding to the cell wall) herbeiführten, was ihm Anlaß zu der Hypothese gab, daß diese Bindung des Enzyms an die Zellwand die Methylierung des Pektins begünstigte und daher die Zellwandplastizität erhöhe. Leider untersuchte Glassiou keine nichtaktiven Auxinisomere, wie z.B. 2,6 Dichlorphenoxyessigsäure oder 2,4,6 Trichlorphenoxyessigsäure auf ihre Bindungskapazitäten. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß die Bindung von Pektinmethylesterase an die Zellwand durch diese nichtaktiven Verbindungen ebenso herbeigeführt wird, was Glassious Hypothese des Auxinmechanismus hinfällig machen würde.

Man muß nun einen Zusammenhang zwischen Zellwandkatalyse und der Auslösesubstanz Auxin herzustellen suchen. Dazu wird folgende Arbeitshypothese der Reaktionsabläufe vorgeschlagen.



Auxin und Nichtauxine können aktiviert werden, jedoch müßte die richtige Auxinkonfiguration bevorzugt an den Receptor gebunden werden oder nur die richtige Auxinkonfiguration am Receptor einen funktionsfähigen Komplex liefern. Dieser Auxin-rezeptorkomplex, die lang postulierte "catalytic entity" müßte den geforderten Umbau der Wandsubstanz bewirken, dadurch sekun-

där eine Atmungssteigerung hervorrufen und letztlich zum Wachstum der Zelle führen.

Sinn dieser Arbeit soll es gewesen sein, den ersten Teil des Schemas, die enzymatische Aktivierung von Auxinen, wenn auch nur an einem Modellsystem, zu demonstrieren, geeignete Tests herauszuarbeiten und Vorarbeiten zum Studium der gebundenen Auxine und Stoffwechselprodukte von Auxinen zu liefern. Künftige Arbeiten werden hauptsächlich die Aufklärung der noch unbekannten Stoffwechselprodukte von NES, N_1 und N_2 , sowie von Benzoessäure, B_2 und B_3 , zum Ziele haben. Ebenso sollen quantitative Zusammenhänge beim Auftreten dieser Produkte festgestellt und an zelleigene Rezeptoren (Proteine etc.) gebundenes Auxin untersucht werden und zwar mit Hilfe von markiertem 2,4-D das ja in der Zelle kaum metabolisiert wird und daher keine störenden Nebenprodukte liefert.

V. Zusammenfassung.

1. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die Reaktionen von Auxinen, besonders IES, in der Zelle zu untersuchen. Nachdem nach Mitteilungen anderer Autoren IES sowohl in tierischen wie auch in pflanzlichen Zellen in vivo mit Aminosäuren konjugiert wird, wurde besonders der Mechanismus der Aktivierung und Konjugierung der Auxine in vitro studiert.
2. Die Aktivierung des Heterocyclus IES mit dem fettsäuren-aktivierenden Enzym folgt dem bekannten Mechanismus von Mahler et al. (1953), $K_m = 3.7 \times 10^{-4}$ mol/l. IES-CoA als Reaktionsprodukt konnte mit einem spezifischen Test festgestellt und durch Isolierung chromatographisch identifiziert werden.
3. Eine Synthese für IES-AMP wird beschrieben, bei der der Kohlensäureäthylester der IES in Tetrahydrofuran mit dem Lithiumsalz von AMP in wässriger Lösung unter Pyridin-Katalyse in Reaktion gebracht wurde.
4. IES-AMP erwies sich als Zwischenprodukt in der enzymatischen Synthese von IES-CoA aus IES. Folgender Mechanismus der Aktivierung trifft daher auch für heterocyclische Carbonsäuren zu.
$$\begin{aligned} \text{IES} + \text{ATP} &\rightleftharpoons \text{IES-AMP} + \text{PP}, \\ \text{IES-AMP} + \text{CoA-SH} &\rightleftharpoons \text{IES-CoA} + \text{AMP} \end{aligned}$$
5. Die Konjugierung der IES mit Glycin läuft über IES-CoA als Intermediärprodukt.
6. Lösliche Extrakte von Kalbsleber-Mitochondrien konjugieren bei Zusatz von Mg^{++} , ATP und CoA, Benzoesäure mit L-Asparagin zu N-Benzoylasparagin, nicht aber mit DL-Asparaginsäure.
7. Es wurde ein Enzym in einem Kalbsleber-Mitochondrien-Extrakt und in vivo in Erbseninternodien nachgewiesen, das Indolthioessigsäure zu IES und H_2S hydrolysiert. Das dabei

in Freiheit gesetzte H_2S scheint die gesteigerte herbicide Wirkung von Auxinthioessigsäuren hervorzurufen.

8. Wird $1\ C^{14}$ Naphthylessigsäure mit Erbseninternodien inkubiert, so treten nach Alkoholabtötung des Gewebes und Chromatographie des Extraktes neben NES und Naphthylacetylasparaginsäure auch 2 neue unbekannte Produkte N_2 und N_3 auf.
9. Das gleiche gilt für markierte Benzoesäure, wo neben Benzoylasparaginsäure ebenfalls 2 unbekannte Produkte B_2 und B_3 auftreten. Im Gegensatz zu Mitteilungen anderer Autoren tritt kein Benzamid auf.
10. Das Reaktionsprodukt von aktivierten 2,4-D-Derivaten mit Hydroxylamin, nämlich die 2,4-D-Hydroxamsäure, ist im Avenazy lindertest ebenso aktiv wie 2,4-D. Es konnte ein Enzym mit dem pH Optimum bei pH 7.5-8 nachgewiesen werden, das die Hydroxamsäure in Hydroxalamin und 2,4-D spaltet. Es handelt sich wahrscheinlich um einen neuen Typ einer Hydrolase.
11. Die Aktivierung von Auxinen wird im Zusammenhang mit der Wuchsstoffwirkung diskutiert.

D a n k s a g u n g

=====

Herrn Professor Dr.A.C.Leopold danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, sowie für die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu können und für sein ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Professor Dr.L.Brauner und Herrn Dr.O.Kandler danke ich für die freundliche Vermittlung dieser Arbeitsmöglichkeit in den U.S.A.

VI. Literaturverzeichnis.

- Andreae, W.A. 1958. Vortrag auf dem "meeting of the American Society of Plant Physiologists", 25. August 1958, Indiana University, Bloomington, Indiana. U.S.A. Metabolism of Indoleacetic acid by Pea roots.
- Andreae, W.A. and N.Good 1955. The formation of Indoleacetyl-aspartic acid in pea seedlings. *Plant Phys.* 30: 380-382.
- Andreae, W.A. and M.W. van Ysselstein 1956. Studies on 3-Indoleacetic acid metabolism. III. The uptake of 3-Indoleacetic acid by pea epicotyls and its conversion to 3-Indoleacetyl-aspartic acid. *Plant Phys.* 31: 235-240.
- Andreae, W.A. and N.Good 1957. Studies on 3-Indoleacetic acid metabolism. IV. Conjugation with aspartic acid and ammonia as processes in the metabolism of carboxylic acids. *Plant Phys.* 32: 566-572.
- Armstrong, M.D., K.N.F. Shaw, M.J. Gortatowski and H. Singer 1958. The Indole acids of human urine. Paper chromatography of Indole acids. *J. Biol. Chem.* 232: 17-30.
- Avison, A.W.D. 1955. The synthesis of acyl phosphates in aqueous solution. *J. Chem. Soc.* 732-738.
- Bandurski, R.S. and B. Axelrod 1951. The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. *J. Biol. Chem.* 193: 405-410.
- Beevers, H. and D.A. Walker 1956. The oxydative activity of particulate fractions from germinating castor beans. *Biochem. Jour.* 62: 114-120.
- Beinert, H., D.E. Green, P. Hele, H. Hift, R.W. von Korff and C.V. Ramakrishnan 1953. The acetate activating enzyme system of heart muscle. *J. Biol. Chem.* 203: 35-45.
- Berg, P. 1955. Participation of adenylyl-acetate in the acetate-activating system. *J. Amer. Chem. Soc.* 77: 3163-3164.
- Berg, P. 1956. Acyl adenylylates, the synthesis and properties of acyl adenylylacetate. *J. Biol. Chem.* 222: 1015-1023.
- Berger, J. and G.S. Avery 1944. Chemical and physiological properties of maize auxin precursor. *Amer. Jour. Bot.* 31: 199-203.
- Binkly, F. 1949. The enzymatic hydrolysis and oxydation of monothio phosphate. *J. Biol. Chem.* 181: 317-322.
- Bonner, J., R.S. Bandurski and A. Millard 1953. Linkage of respiration to auxin induced water uptake. *Physiol. Plant* 6: 511-522.

- Bonner, J., L. Ordian and R. Cleland 1956. Auxin-induced water uptake. In chemistry and mode of action of plant growth substances. Butterworths Scientific Publications. London. 260-270.
- Boroughs, H. and J. Bonner 1953. Effects of indoleacetic acid on metabolic pathways. Arch. Biochem. 46: 279-290.
- Brady, R.O. and E.R. Stadtman 1954. Enzymatic thioltransacetylation. Federat. Proc. 13: 186.
- Brauner, L. und M. Hasman 1952. Weitere Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Heteroauxins bei der Wasseraufnahme von Pflanzenparenchymen. Protoplasma 41: 302-326.
- Burström, H. 1954. Studies on growth and metabolism of roots. XI. Auxin and Coumarin derivatives on the cellwall. Physiol. Plant. 7: 548-559.
- Burström, H., B. Sjöberg and B.A.M. Hansen 1956. The plant growth activity of phenoxy-thioacetic acids. Acta Agr. Scand. VI: 155-177.
- Busse, M. und O. Kandler, 1956. Über die Wirkung der β -Indolyl-essigsäure auf den Stoffwechsel von Avenacoleoptilen. Planta, 46: 619-642.
- Castelfranco, P., K. Moldave and A. Meister 1958. Incorporation of the amino acid moieties of amino acid-adenylic acid anhydrides into proteins. J. Am. Chem. Soc. 80: 2335.
- Chantrenne, H. 1951. The requirement for coenzyme A in the enzymatic synthesis of hippuric acid. J. Biol. Chem. 189: 227-233.
- Chantrenne, H. 1955. Hippuric acid synthesis. In: methods in enzymology. II. Academic Press inc. Publishers. New York. 346-350.
- Commoner, B. and D. Mazia 1942. The mechanism of auxin action. Plant Physiol. 17: 682-685.
- Commoner, B., S. Fogel and W.H. Müller 1943. The mechanism of auxin action. The effect of auxin on water absorption by potato tuber tissue. Am. Jour. Bot. 30: 23-38.
- Cramer, F. 1958. Papierchromatographie. Verlag Chemie, G.m.b.H., Weinheim.
- Czaja, A. Th. 1935. Wurzelwachstum, Wuchsstoff und die Theorie der Wuchsstoffwirkung. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 53: 221-245.

- Davie, E.W., V.V.Koningsberger and F.Lipmann 1956. The isolation of a tryptophan-activating enzyme from pancreas. Arch.of Biochem.and Biophys. 65: 21-38.
- Decker, P. 1957. Über das Vorkommen eines Stoffwechselproduktes der β -Indolyl-3-Propionsäure im normalen Harn. Naturwissenschaften 44: 330.
- DeMoss, J., S.Gnuth and D.Novelli 1956. The enzymatic activation of amino acids via their acyladenylate derivatives. Proc.Nat.Acad.Sci.42: 325-352.
- Elliott, W.H. 1953. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. J.Biol.Chem. 201: 661-672.
- Ewins L. and H.Laidlaw, 1913. The fate of Indolethylamine in the organism. Biochem.Journ.7: 18-25.
- Fawcett, C.H., H.F.Taylor, R.L.Wain and F.Wightman 1956. The degradation of certain phenoxy acids, amides and nitriles with in plant tissues. In: The chemistry and mode of action of plant growth substances. Butterworths scientific Publications. London, 182-194.
- Fawcett, C.H., R.L.Wain and F.Wightman 1958. Beta-oxydation of omega (3-indolyl) alkene carboxylic-acids in plant tissue. Nature 181: 1387-1389.
- Feigl, F. 1954. "Spot Tests" Vol.II.p.170. Elsevier, Hauston, Texas.
- Fieser, L.F. und M.Fieser 1954. Lehrbuch der organischen Chemie. Verlag Chemie G.m.b.H. Weinheim/Bergstr.
- Fiske, C.H. and Y.Subbarow 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J.Biol.Chem.66: 375-400.
- Flynn, R.M., M.E.Jones and F.Lipmann 1954. A colorimetric determination of inorganic pyrophosphate. J.Biol. Chem. 211: 791-796.
- Frear, D.S. and R.C.Burell 1955. Spectralphotometric method for determining hydroxylamin-reductase activity in higher plants. Anal.Chem.27: 1664-1665.
- Galston, A.W. 1956. Some metabolic consequences of the administration of indoleacetic acid to plant cells. In: The chemistry and mode of action of plant growth substances. Butterworths Scientific Publications, London, 219-239.
- Gergely, J., P.Hele and C.V.Ramakrishnan 1955. Succinyl and acetyl coenzym A deacylases. J.Biol.Chem.198: 323-334.

- Gignais, P.V. and I.Zabin 1958. Synthesis and properties of palmityl adenylate, palmityl coenzym A and palmityl glutathione. *Biochim. and Biophys. Acta* 29: 263-269.
- Glasziou, K.T. 1957a. The effect of 3-indolyl acetic acid on the binding of pectinmethylesterase to the cellwalls of tobacco pith. *Austr.J.Biol.Sci.*10: 337-341.
- Glasziou, K.T. 1957b. The effect of auxins on the binding of pectin methylesterase so cellwall preparations. *Austr.J.Biol.Sci.*10: 426-434.
- Glasziou, K.T. and S.C.Inglis 1958. The effect of auxins on the binding of pectin-methylesterase to cellwalls. *Austr.J.Biol.Sci.*11: 127-141.
- Goddu, R.F., N.F.LeBlanc and C.M.Wright 1955. Spectrophotometric determination of esters and anhydrides by hydroxamic acid reaction. *Anal. Chem.*27: 1251-1255.
- Gomori, G. 1955. Preparation of Buffers for use in enzyme studies in methods of enzymology. I. Academic Press Inc. Publishers, New York, 138-146.
- Good, N.E. 1956. The synthesis of indole-3-acetyl-DL-aspartic acid and related compounds. *Canadian J.Chem.*34: 1356-1358.
- Good, N.E., W.A.Andreae and M.W.van Ysselstein 1956. Studies on 3-indoleacetic metabolism. II. Some products of the metabolism of exogenous indoleacetic acid in plant. *Plant Phys.*31: 231-235.
- Gordon, S.A. 1946. Auxin-protein complexes of the wheat grain. *Amer.Jour.Bot.*33: 160-169.
- Gordon, S.A. 1956. The biogenesis of natural auxins. In: The chemistry and mode of action of plant growth substances. Butterworth Scintific Publications, London, 65-75.
- Gunsalus, I.C., B.L.Horecker and W.A.Wood 1955. Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms. *Bact. Rev.*19: 79-128.
- Hauser, C. and W.Renfrow 1944. Organic synthesis. John Wiley u. Sons Inc.New York, 2: 67.
- Heppel, L.A. 1955. Inorganic pyrophosphatase from yeast. In: Methods in enzymology.II.Academic Press Inc., Publishers New York. 570-576.
- Heppel, L.A. and R.J.M.Hilmoe 1951. Purification and properties of 5-nucleotidase. *J.Biol.Chem.*188: 665-676.

- Heyn, A.N.J. 1932. Recherches sur les relations de la plasticité de membranes cellulaires et la croissance des végétaux. *Compt.Rend.Acad.Sci.*194: 1848-1850.
- Hitchcock, A.E. and P.W.Zimmermann 1942. Root-inducing activity of phenoxy compounds in relation to their structure. *Contr.Boyce Thompson Inst.* 12: 497-507.
- Hoagland, M.B., P.C.Zamecnik and E.B.Keller 1956. Enzymatic carboxylactivation of amino acids. *J.Biol.Chem.* 218: 345-358.
- Hoagland, M.B., P.C.Zamecnik and M.L.Stephenson 1957. Intermediate reactions in protein biosynthesis. *Biochim.and Biophys. Acta* 24: 215-216.
- Hoagland, M.B., M.L.Stephenson, J.F.Scott, L.I.Hecht and P.C.Zamecnik 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J.Biol.Chem.*231: 241-257.
- James, W.O. 1953. The use of respiratory inhibitors. *Ann.Rev. Plant Physiol.* 4: 59-90.
- Jencks, W.P. and F.Lipmann 1957. Studies on the initial step of fatty acid activation. *J.Biol.Chem.*225: 207-223.
- Jepson, J.B. 1956. Indoleacetyl-glutamine in hartnup-disease. *Biochem.Journ.*64: 14 p.
- Jepson, J.B. 1958. Indoleacetamid a chromatographic artifact from the natural indoles, indoleacetylglucosiduronic acid and indolepyruvic acid. *Biochem.Journ.*69: 22 p.
- Jerchel, D. und R.Staab-Müller 1954. Analytische Kennzeichen und Wuchsstoffwirkung von Homologen und Peptiden der Indol-e-Essigsäure. *Z.f.Naturforschg.*9b: 411-415.
- Jönson, A., G.Nilson and H.Burström 1952. Synthetic plant hormones. *Acta Chem.*6: 993-998.
- Jones, M.E., S.Black, R.M.Flynn and F.Lipmann 1953a. Acetyl coenzyme A synthesis through pyrophosphoryl split of adenosintriphosphate. *Biochim.et Biophys.Acta* 12: 141-149.
- Jones, M.E., F.Lipmann, H.Hilz and F.Lynen, 1953b. On the enzymatic mechanism of coenzyme A acetylation with adenosine triphosphate and acetate. *J.Amer.Chem. Soc.* 75: 3285-3286.
- Kamien, E. and A.C.Leopold 1957. Inhibitors of polar auxin-transport. *Phys.Plantarum* 10: 29-38.
- Kellermann, G.M. 1958. Benzoyladenylates and hippuryladenylate. Preparation, properties and relationship to the synthesis and transport of hippuric acid. *J.Biol.Chem.* 231: 427-443.

- Kimming, J., W. Sticherling, R. Tschesche und H.G. Urbach 1958. N-(B(Indolyl(3))acryloyl)glycin, Isolierung aus Harn und Synthese. Hoppe Seylers Z.f. Physiol. Chem. 311: 149-284.
- Kögl, F., A.J. Haagen-Smit und H. Erxleben 1934. Über ein neues Auxin (Heteroauxin) aus Harn. XI. Mitteilung. Z. Physiol. Chem. 228: 90-103.
- Kossel, A. 1888. Über das Adenin. Hoppe Seylers. Z. Physiol. Chem. 12: 241-253.
- Kunitz, M. 1952. Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from baker yeast. Journ. Gen. Physiol. 35: 423-450.
- Lam., S., A.C. Leopold and M.H. Zenk 1958. Unveröffentlichte Versuche.
- Larsen, P. 1951. Formation, occurrence and inactivation of growth substances. Ann. Rev. Plant Physiol., 2: 169-198.
- Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Methods in enzymologie. III. Academic Press Inc. New York. 447-454.
- Leopold, A.C. 1955. Auxins and plant growth. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Leopold, A.C. and F.S. Guernsey 1953. A theory of auxin action involving CoA. Proc. Nat. Ac. Sci. 39: 1105-111.
- Leopold, A.C. and C.A. Price 1956. The influence of growth substances upon sulphhydryl compounds. In: Chemistry and mode of action of plant growth substances. Butterworths Scientific Publications, London, 271-283.
- Lineweaver, H. and D. Burk, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56: 658-666.
- Lipmann, F. and L.C. Tuttle 1945. Specific micromethod for the determination of acylphosphates. J. Biol. Chem. 159: 21-28.
- Lynen, F. 1953. Functional group of coenzyme A and its metabolic relations, especially in the fatty acid cycle. Fed. Proc. 12: 683-691.
- Lynen, F., E. Reichert und L. Rueff 1951. Zum biologischen Abbau der Essigsäure VI. Aktivierter Essigsäure, ihre Isolierung aus Hefe und ihre chemische Natur. Ann. 574: 1-32.
- Lynen, F. und K. Decker 1957. Das Coenzym A und seine biologischen Funktionen. Erg. der Physiologie biol. Chemie und Exper. Pharmakologie. 49: 327-424.

- Mahler, H.R., S.J.Wakil and R.M.Bock 1953. Studies on fatty acid oxydation. I.Enzymatic activation of fatty acids. J.Biol.Chem.204: 453-468.
- McGilvery R.W. and P.Cohen 1950. Enzymatic synthesis of ornithuric acids. J.Biol.Chem.183: 179-189.
- Meister, A. 1950. Reduction of alpha, gamma diketo and alpha-keto acids catalyzed by musclepreparations and by cristalline lactic dehydrogenase. J.Biol.Chem.184: 117-129.
- Meister, A., P.E.Fraser and S.V.Tice 1954. Enzymatic desulfuration of B-mercapto pyruvate to pyruvate. J.Biol.Chem.206: 561-575.
- Moewus, F. 1950. Gebundener und freier Wuchsstoff in fleischigen Früchten. Planta 37: 413-430.
- Moldave, K. and A.Meister 1957. Preparation of phenylacetyl-adenylate in the enzymatic synthesis of phenylacetyl glutamine. Biochim.and Biophys.Acta, 25: 434-435.
- Morell, S.A. and R.M.Bock 1954. An attempt to establish precise spectral characteristics for highly purified crystalline disodium adenosine triphosphate. Am. Chem.Soc. 126th meeting, N.Y. Div.of Biol.Chem. Abstr.44 C.
- Moyed, H.S. and F.Lipmann 1957. Studies on the adenosine triphosphate-propionate reaction in extracts of an unidentified bacterium. Journ.of Bact.73: 117-121.
- Muir, R.M. 1947. The relationship of growth hormones and fruit development. Proc.Nat.Acad.Sci.33: 303-312.
- Muir, R.M., C.H.Hansch and A.H.Gallup 1949. Growth regulation by organic compounds. Plant Physiol. 24: 359-366.
- Nachmansohn, D., I.B.Wilson, S.R.Korey and R.Bergman 1952. Cholinacetylase VI. Substitution of adenosin triphosphate acetate by thiolacetate. J.Biol.Chem.195: 23-35.
- Neilands, J.B. and P.K. Stumpf 1958. Outlines of enzyme chemistry. John Wiley u.Sons, Inc., N.Y.Publishers.
- Northern, H.T. 1942. Relation of dissociation of cellular protein by auxin to growth. Bot.Gaz., 103: 668-683.
- Ordin, L., R.Cleland and J.Bonner 1955. Influence of auxin on cellwall metabolism. Proc.Nat.Acad.Sci.41: 1023-1029.
- Peng, C.H.L. 1956. Butyryl adenylate and its possible function in the fatty acid activating system. Biochim. and Biophys. Acta 22: 42-48.

- Schachter, D. and J.V.Taggart 1953. Benzoylcoenzyme A and hippurate synthesis. *J.Biol.Chem.*203: 925-934.
- Schachter, D. and J.V.Taggart 1954. Glycine N-acylase: Purification and properties. *J.Biol. Chem.* 208: 263-275.
- Sen, S.P. and A.C.Leopold 1954. Paperchromatography of plant growth regulators and allied compounds. *Physiol. Plantarum* 7: 98-108.
- Siegel, S.M. and A.W.Galston 1953. Experimental coupling of indoleacetic acid to pea root protein. *Proc.Nat. Acad.Sci.*39: 1111-1118.
- Skoog, F. and K.V.Thimann 1940. Enzymatic liberation of auxin from plant tissues. *Science* 92: 64.
- Smythe, C.V. 1955. Desulfhydrases and dehydrases. In: *Methods in enzymology II*. Academic Press Inc.N.York 315-324.
- Szent-Györgyi, A. 1957. Bioenergetics. Academic Press Inc. New York.
- Söding, H. 1952. Die Wuchsstofflehre. Georg Thime Verlag, Stuttgart.
- Stadtman, E.R. 1952. The net enzymatic synthesis of acetyl coenzym A. *J.Biol.Chem.* 196: 535-546.
- Stumpf, P.K. and G.Barber 1956. Fat metabolism in higher plants. VII. β -oxidation of fatty acids by peanut mitochondria. *Plant Physiol.* 31: 304-308.
- Talbert, P.T. and F.M.Huennekens 1956. Chemical synthesis and properties of butyryladenylate. *J.Am.Chem.Soc.* 78: 4671-4675.
- Tanaka, Z. 1940. Behaviour of some plant hormones in the animal body. *J.Pharm.Soc.Japan.* 60: 362-367.
- Tang, Y.W. and J.Bonner 1947. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. *Arch.Biochem. and Biophys.* 13: 11-25.
- Thimann, K.V. 1948. Plant growth hormones. The hormones: Physiology, chemistry and applications. Academic Press, Inc. New York.
- Thimann, K.V. 1951. The synthetic auxins: Relation between structure and activity. In: *Plant growth substances*. Univ. of Wisc. Press, Madison.
- Thimann, K.V. 1952. The role of ortho substitutions in the synthetic auxins. *Plant Physiol.* 27: 392-404.
- Thompson, H.E., C.P. Swanson and A.G.Norman 1947. New growth regulating compounds. I. *Botan.Gaz.*107: 476-507.

- Toenniss, G. and J.J.Kolb 1951. Techniques and reagents for paper chromatography. Anal.Chem. 23: 823-826.
- Turian, G. 1956. Stimulation de l'activite phosphatasique acide d'extraits de pomme de terre et de maïs par l'heteroauxine. Biochim. et Biophys. Acta 12: 388-389.
- Veldstra, H. 1956. On from and function of plant growth substances. In: The chemistry and mode of action of plant growth substances. Butterworth Scientific Publishers, London. 117-133.
- Virtanen, A.I. and N.E.Sanis 1956. Organic hydroxylamine compounds formed from nitrite in torulopsis utilis.II. Acetyl-hydroxamic acid. Acta Chem. Scand.10: 483-485.
- Virtanen, A.I. 1957. Über neue Aminosäuren und andere physiologisch bedeutungsvolle Stickstoffverbindungen in höheren Pflanzen. Festschrift Arthur Stoll. Copyright 1957 by Sandoz A.G., Basel.
- Wieland, Th. und G.Hörlein 1955. Synthesen einiger β -Indolacetyl-Aminosäuren und Peptide. Ann. 591: 192-199.
- Wieland, Th., E.Niemann und G.Pfleiderer 1956. Synthese und Eigenschaften von Aminosäure-Adenylsäure-Anhydriden. Angew.Chem. 68: 305.
- Wieland, Th. und H.Merz 1958. In vitro-Reaktion von Proteinen mit aktivierten Aminosäuren. Biochem.Zeitschr.330: 521-537.
- Wildman, G.S. and S.Gordon 1942. The release of auxin from isolated leaf proteins of spinach by enzymes. Proc.Nat.Acad.Sci.28: 217-228.
- Wildman, G.S. and J.Bonner 1947. The proteins of green leaves. I. Isolation, enzymatic properties and auxin content of spinach cytoplasmatic proteins. Arch.Biochem. 14: 381-413.
- Wilske, C. and H.Burström 1950. The growth-inhibiting action of thiophenoxyacetic acids. Physiol.Plantarum 3: 58-67.
- Zenk, M.H. 1958. Master of science thesis. Purdue University Lafayette, Ind.U.S.A. Activated Derivitives of 3-Indoleacetic Acid.

Lebenslauf

Am 4.2.1933 wurde ich, Meinhard Zenk, als Sohn des Studienprofessors Hans Zenk und seiner Ehefrau Marie Zenk, geb. Zeise, in Donauwörth (Bayern) geboren. Von 1939-1943 besuchte ich die Volksschule, von 1943-1952 die Oberrealschule in Donauwörth. 1952 legte ich dort das Abitur ab und immatrikulierte mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Erlangen. Nach dreisemestrigem Chemiestudium wechselte ich Studienort und Fach und immatrikulierte mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München. Vom Wintersemester 1954/55 bis Sommersemester 1956 studierte ich an der hiesigen Universität und arbeitete dort seit dem Wintersemester 1955/56 unter Anleitung von Herrn Dr.O.Kandler. Durch Vermittlung von Herrn Professor Dr.L.Brauner und Dr.O.Kandler konnte ich ein "Research Assistantship" an der Purdue University, Lafayette, Indiana, U.S.A. bei Herrn Professor Dr.A.C.Leopold erhalten. Vom Wintersemester 1956/57 an arbeitete ich an meiner Dissertation unter Anleitung von Professor Leopold. Im Sommersemester 1958 legte ich die Prüfungen zum "Master of Science in Plant Physiology" ab.

